

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

Glicoproteínas de la envoltura del HCV: implicación del péptido fusogénico de E1 y de los dominios transmembrana en las propiedades estructurales y funcionales del complejo E1-E2

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Laura Lombana Sacristán

Directores

Francisco Gavilanes Franco

Julián Gómez Gutiérrez

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**GLICOPROTEÍNAS DE LA ENVOLTURA DEL HCV: IMPLICACIÓN DEL
PÉPTIDO FUSOGÉNICO DE E1 Y DE LOS DOMINIOS
TRANSMEMBRANA EN LAS PROPIEDADES ESTRUCTURALES Y
FUNCIONALES DEL COMPLEJO E1-E2**

Dirigida por:

Dr. Francisco Gavilanes Franco

Dr. Julián Gómez Gutiérrez

TESIS DOCTORAL

Laura Lombana Sacristán

Madrid, 2015

Imagen de la portada: *Boehringer Ingelheim*

“La constancia es la virtud por la cual todas las virtudes dan fruto”

Arturo Graf (1848-1913) Escritor y poeta italiano

***A todos los que habéis
creído en mí***

Un total de 65 037 palabras son las que resumen este trabajo de casi cinco años en el cual he aprendido tanto y he crecido tanto personalmente. Sin embargo, no hay palabras suficientes para mostrar mi agradecimiento a todas las personas que lo han hecho posible.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis, los Dres. Francisco Gavilanes Franco y Julián Gómez Gutiérrez de la Universidad Complutense de Madrid haberme dado la oportunidad de realizar la tesis en el grupo de Proteínas Virales, así como a la Dra. Belén Yélamos López que también ha participado en esta tarea de dirección. A los tres les debo todas las facilidades que he tenido para llevar a cabo mi trabajo durante estos años y las innumerables opiniones y consejos que me han ayudado a sacarlo adelante. Sin duda, le debo el mayor de mis agradecimientos al Dr. Daniel Tello que me metió en el cuerpo el gusanillo de la investigación y a la Dra. Sara Ortega Atienza, ella me acogió desde el principio, me enseñó todo lo necesario para llegar a este punto, me ayudó a llevar a cabo gran parte de mis experimentos y sobre todo fue una gran compañera y es y será una gran amiga siempre.

No puedo dejar de mencionar al Dr. Ismael Mingarro Muñoz de la Universidad de Valencia por haberme dado la oportunidad de realizar cuatro estancias en su laboratorio sin las cuales gran parte de esta tesis no hubiera existido. Gracias por admitirme, por dejarme usar todos vuestros recursos y por las largas horas de discusión de resultados donde, hasta el detalle más insignificante en un principio nos hacía desarrollar hipótesis sorprendentes. Evidentemente, esto no hubiera sido posible sin la ayuda incondicional de la gente de su laboratorio: Carlos, Vicente, María Jesús y Luis (aunque hayamos coincidido menos), gracias por enseñarme a hacer tantas cosas nuevas para mí, con tanta paciencia y gracias por vuestras ideas y sugerencias. Suerte en vuestro futuro científico.

Asimismo, tengo que agradecer al Dr. Dirk Schneider de la Universidad Johannes Gutenberg de Mainz (Alemania) y a su grupo haberme permitido desarrollar mi estancia predoctoral en su laboratorio y el empeño que pusieron para sacar adelante mi trabajo. Aunque los resultados no fueron los esperados, la experiencia personal fue maravillosa.

De estos años en el L-3 me llevo mucho aprendizaje, muchas alegrías y sinsabores pero sobre todo me llevo grandes amistades. Sara, gracias por enseñarme a trabajar entre risas y cotilleos, contigo todo era muy fácil. Clara, fuiste mi gran apoyo en la etapa más dura de la tesis, gracias por enseñarme protocolos “made by Clara” y por animarme a seguir adelante cuando todo parecía derrumbarse. Lucía, gracias por demostrarme que a pesar de que los años pasen, la ciencia puede seguir apasionándote y que esta vida es compatible con tener una familia y con sonreír cada

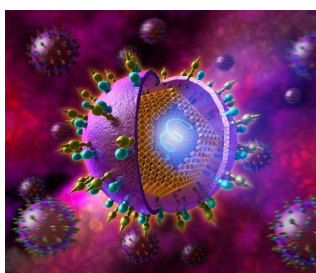
día. Sara Abián, pasarán los años y seguirás apareciendo en todos los agradecimientos porque no hay nada mejor que la experiencia para dedicarse a esto con la habilidad con la que lo haces tú y por el cariño con el que nos enseñas a uno tras otro. Miriam, entramos juntas en esto y salimos juntas, qué te voy a decir, gracias por ser la espabilada de la promoción y por avisarme de todos los papeles y plazos siempre. Sarita, muchos años juntas, desde la primera clase de Biología de la carrera, donde no sabía ni cómo era una célula casi, gracias por tu apoyo cuando te he necesitado y mucho ánimo que la siguiente eres tú. Gracias a todas por haber estado además fuera del labo, por esas meriendas y cañas donde no dejamos títere con cabeza, por los consejos, los ánimos y vuestras risas en los cafés y las comidas en el 5. No me olvido de María y Ruth que también compartieron esos momentos, de Rodrigo, de Javi, y de todos los que nos vais tomando el relevo; Esperanza, Moisés, Laura, Juan Carlos, Rorri, Pablo... mucha suerte en el futuro.

Antes de acabar, quiero expresar mi agradecimiento a mi familia y amigos, que a pesar de no tener a veces muy claro en qué invertía tantas horas de mi vida me han apoyado siempre. Azahara, María y de nuevo Sarita, gracias por estar siempre al pie del cañón desde los primeros días de universidad, por las meriendas, las cenas, los atracones de chocolate y porque en compañía, los fracasos científicos no lo parecen tanto y los éxitos se celebran mucho mejor.

Sin embargo, todo esto no hubiera sido posible sin la inestimable confianza que mis padres han puesto en mí desde el principio. Gracias por haberme dado el privilegio de tener esta educación, por haberme apoyado cuando decidí llevar a cabo mi sueño y estudiar Bioquímica, por haberos ilusionado con mis alegrías y llorado con mis penas y por estar ahí cada día. Mamá, gracias por enseñarme a desenvolverme en la vida y a ser una mujer independiente. Papá, gracias por haberme inculcado tus ganas de saber y por enseñarme a controlar mi carácter. Sois unas personas increíbles de las que me queda mucho que aprender.

Por último, y no por ello menos importante, tengo que mencionar a la persona con la que todo cobró sentido. Nuestra historia empezó a la vez que esta tesis, ahora, casi cinco años después sé que sin ti no hubiera sido posible. Gracias Diego por estar ahí siempre, por escucharme cuando te hablo de PCR y citometrías y por celebrar cada uno de mis éxitos aunque sean tan simples como una única colonia positiva. Gracias por tu entusiasmo, tu alegría, tus ánimos y sobre todo, gracias por hacerme reír cada día. Formamos el equipo perfecto.

Gracias a todos por haberme acompañado en este camino tan enriquecedor y por haberme sacado una sonrisa siempre.



ÍNDICE

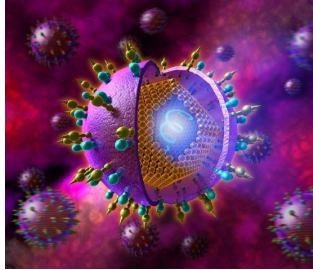
ÍNDICE

ABREVIATURAS	3
ENGLISH SUMMARY	9
RESUMEN.....	17
1. EL VIRUS DE LA HEPATITIS C	25
1.1. PERSPECTIVA GENERAL.....	25
1.2. ESTRUCTURA DEL HCV	28
1.3. EL GENOMA VIRAL	29
1.4. PROTEÍNAS VIRALES.....	31
1.4.1. PROTEÍNAS ESTRUCTURALES	33
1.4.2. PROTEÍNA p7	35
1.4.3. PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES (NS)	35
1.5. LAS GLICOPROTEÍNAS DE LA ENVOLTURA E1 Y E2	37
1.5.1. BIOGÉNESIS	37
1.5.2. PLEGAMIENTO.....	38
1.5.3. ECTODOMINIOS.....	39
1.5.4. LOS DOMINIOS TRANSMEMBRANA	45
1.5.5. GLICOSILACIÓN.....	49
1.6. EL CICLO INFECTIVO DEL HCV	51
1.6.1. UNIÓN Y ENTRADA DEL HCV EN LAS CÉLULAS DIANA	57
1.6.2. FUSIÓN	63
1.6.3. REPLICACIÓN	67
1.6.4. ENSAMBLAJE VIRAL Y LIBERACIÓN.....	69
1.7. RESPUESTA INMUNE FRENTE A LA INFECCIÓN.....	70
2. OBJETIVOS	75
3. MATERIALES.....	79
3.1. MICROORGANISMOS	79
3.1.1. CEPAS DE <i>E. coli</i>	79
3.1.2. LÍNEAS CELULARES DE INSECTO	79
3.1.3. LÍNEAS CELULARES DE MAMÍFERO	79

3.2. VECTORES PLASMÍDICOS	80
3.2.1. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN <i>BACULOVIRUS</i>	80
3.2.2. PRODUCCIÓN DE PSEUDOPARTÍCULAS VIRALES EN CÉLULAS HEK 293T.....	80
3.2.3. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INSERCIÓN EN MEMBRANA	81
3.2.4. ESTUDIOS DE COMPLEMENTACIÓN DE GFP	81
3.3. MEDIOS DE CULTIVO.....	82
3.3.1. MEDIO DE CULTIVO DE <i>E. coli</i>	82
3.3.2. MEDIO DE CULTIVO DE <i>BACULOVIRUS</i>	82
3.3.3. MEDIO DE CULTIVO DE CÉLULAS EUCARIOTAS.....	82
3.4. DISOLUCIONES DE USO GENERAL.....	82
4. MÉTODOS	85
4.1. TÉCNICAS DE GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	85
4.1.2. ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA.....	85
4.1.3. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA	85
4.1.4. DIGESTIÓN DE DNA CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	86
4.1.5. LIGACIONES	86
4.1.6. SECUENCIACIÓN DE DNA	86
4.2. MANIPULACIÓN DE DNA PLASMÍDICO BACTERIANO	86
4.2.1. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE <i>E. coli</i>	86
4.2.2. TRANSFORMACIÓN DE <i>E. coli</i>	87
4.2.3. "MINIS" DE COLONIAS.....	87
4.2.4. PURIFICACIÓN DE DNA PLASMÍDICO	88
4.3. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	88
4.3.1. EXPRESIÓN EN <i>BACULOVIRUS</i>	88
4.4. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CON EXTENSIÓN DE HISTIDINAS.....	92
4.4.1. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EXPRESADAS EN <i>TRICHOPLUSIA NI</i>	93
4.5. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA	93
4.6. INMUNODETECCIÓN	94
4.6.1. DETECCIÓN DE LA EXTENSIÓN DE HISTIDINAS.....	94
4.6.2. DETECCIÓN CON ANTICUERPOS ANTI-E2 Y ANTI-E1.....	94

4.7. ENZIMOINMUNOENSAYO (ELISA).....	95
4.7.1. ELISA CON SUEROS DE PACIENTES.....	95
4.7.2. ELISA CON H53	95
4.8. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA	96
4.8.1. ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS.....	96
4.8.2. ESPECTROS DE ABSORCIÓN.....	96
4.9 DETERMINACIÓN TEÓRICA DE PARÁMETROS MOLECULARES.....	96
4.10 ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR	97
4.10.1. CÁLCULO DE ESTRUCTURA SECUNDARIA.....	97
4.11. ESPECTROS DE EMISIÓN DE FLUORESCENCIA INTRÍNSECA.....	97
4.12. ESTUDIOS DE INTERACCIÓN CON LÍPIDOS.....	98
4.12.1. PREPARACIÓN DE VESÍCULAS DE FOSFOLÍPIDOS.....	98
4.12.2. VALORACIÓN DE FÓSFORO	98
4.12.3. ENSAYO DE AGREGACIÓN DE VESÍCULAS DE FOSFOLÍPIDOS.....	98
4.12.4. ENSAYO DE MEZCLA DE LÍPIDOS	99
4.12.5. ENSAYO DE LIBERACIÓN DE CONTENIDOS ACUOSOS.....	100
4.13. ESTUDIO DE LA INTEGRACIÓN EN MEMBRANA POR EL SISTEMA DE TRADUCCIÓN-GLICOSILACIÓN <i>IN VITRO</i>	101
4.13.1. ENSAYO DE PROTEINASA K	102
4.14. DETERMINACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE LOS SEGMENTOS TRANSMEMBRANA: RECONSTRUCCIÓN DE LA PROTEÍNA VENUS (BiFC)	102
4.14.1. MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCENCIA	103
4.14.2. CITOMETRÍA DE FLUJO	104
4.15. PRODUCCIÓN DE PSEUDOPARTÍCULAS DE HCV (HCVpp).....	104
4.15.1. PURIFICACIÓN DE HCVpp EN COJÍN DE SACAROSA	105
4.16. ENTRADA DE LAS HCVpp EN CÉLULAS Huh7.....	106
5. RESULTADOS.....	109
5.1. IMPLICACIÓN DEL SUPUESTO PÉPTIDO FUSOGENICO 268-292 DE E1 EN LAS PROPIEDADES DEL COMPLEJO E1-E2	109
5.1.1. OBTENCIÓN DEL PLÁSMIDO RECOMBINANTE PACGP67A-E2E1 _{Δ268-292}	110
5.1.2. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN	111
5.1.3. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL.....	113

5.1.4. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL: ESTUDIOS DE INTERACCIÓN LÍPIDO- PROTEÍNA	118
5.1.5. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL: GENERACIÓN DE HCVpp.....	122
5.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS DOMINIOS TRANSMEMBRANA DE LAS GLICOPROTEÍNAS DE LA ENVOLTURA E1 Y E2	127
5.2.1. CARACTERIZACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INTEGRACIÓN EN MEMBRANAS.....	130
5.2.2. CARACTERIZACIÓN DEL PRIMER RESIDUO DE LOS DOMINIOS TRANSMEMBRANA DE LAS GLICOPROTEÍNAS DE LA ENVOLTURA E1 Y E2	136
5.2.3. CARACTERIZACIÓN DE LA CAPACIDAD DE HETERODIMERIZACIÓN DE LOS DOMINIOS TRANSMEMBRANA DE E1 Y E2	141
5.2.4. ANÁLISIS DEL MOTIVO DE HETERODIMERIZACIÓN GXXXG EN E1	147
5.2.5. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL: OBTENCIÓN DE HCVpp INFECTIVAS	150
6. DISCUSIÓN	159
6.1. IMPLICACIÓN DEL SUPUESTO PÉPTIDO FUSOGÉNICO 268-292 DE E1 EN LAS PROPIEDADES DEL COMPLEJO E1-E2	159
6.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS DOMINIOS TRANSMEMBRANA DE LAS GLICOPROTEÍNAS DE LA ENVOLTURA E1 Y E2	167
7. CONCLUSIONES.....	179
10. BIBLIOGRAFÍA	185



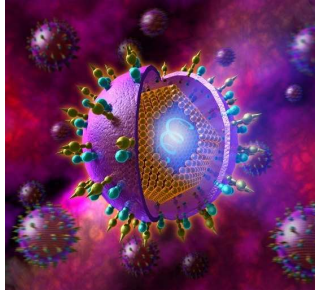
ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

[Θ] _{MRW}	Elipticidad molar por residuo
μ S	Microsomas
AcNPV	Virus de la polihedrosis nuclear <i>Autographa californica</i>
ADRP	Proteína relacionada con la diferenciación adiposa
A _n	Absorbancia a longitud de onda n (nm)
ANTS	Ácido 8-aminonaftaleno 1,3,6-trisulfónico
Apo	Apolipoproteína
ARFP	Proteína de marco de lectura alternativo
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
CCA	<i>Convex Constraint Analysis</i>
CHO	Células de ovario de hámster chino
CK	Caseína quinasa
CLDN1	Claudina 1
CMV	Citomegalovirus
Da	Dalton
DC	Dicroísmo circular
DC-SING	Lectina tipo C específica de las células dendríticas
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DO _n	Densidad óptica a una longitud de onda n (nm)
DPX	Bromuro de N,N'-p-xileno-bis-piridinio
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
Epha2	Receptor Ephrin type-A 2
FBS	Suero fetal bovino
F _{máx}	Fluorescencia máxima
GAG	Glucosaminoglicano
GBV	Virus G. Barker
GFP	Proteína verde fluorescente
gp	Glicoproteína
GT	Glucosiltransferasa
GTP	Guanidina trifosfato
HCV	Virus de la Hepatitis C
HCVcc	Virus HCV en cultivo celular
HCVpp	Pseudopartículas de HCV
HCV _{TPC}	Partículas trans-complementadas del HCV

HDL	Lipoproteína de alta densidad
HEK	Células de riñón embrionario humano
HeLa	Células de cáncer cérvico uterino
Hepes	Ácido 4-(2-hidroxietil)-piperazina-1-etanolsulfónico
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HRP	Peroxidasa de rábano
HS	Heparán sulfato
Huh	Células de hepatoma humano
HVR	Región hipervariable
IF	Intensidad de fluorescencia
IFN	Interferón
Igepal	Octylphenoxypolyethoxyethanol
IgG	Inmunoglobulina G
igVR	Región variable intergenotípica
IRES	Sitio interno de entrada del ribosoma
ISG	Genes estimulados por interferones
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
LD	<i>Lipid droplet</i> o gota lipídica
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LDLr	Receptor de LDL
LEL	Lazo extracelular grande
LPPG	1-palmitoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)
L-SING	Lectina tipo C específica de hígado
MBP	Proteína de unión a maltosa
MD	Dinámica molecular
MLV	Virus de la leucemia murina
MOI	Multiplicidad e infección
NBD-PE	N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il) fosfatidiletanolamina
NK	Linfocitos <i>Natural Killer</i>
NPC1L1	Receptor Niemann-Pick C1-tipo 1
NS	No estructural
NTA	Ácido nitrilotriacético
NTP	Nucleótido trifosfato
OCLN	Ocludina
ORF	Marco de lectura abierto
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PBST	Tampón PBS con detergente Tween 20
PCR	Reacción de la polimerasa en cadena
PDI	Proteína disulfuro isomerasa

PFA	Paraformaldehido
Pfu	Unidades formadoras de placas/enzima polimerasa
PG	Fosfatidilglicerol
PKR	Proteína quinasa R
PMSF	Fluoruro de p-fenilmetilsulfonilo
RE	Retículo endoplásmico
RET	Transferencia de energía por resonancia
Rh-PE	N-(lisamina) rodamina B sulfonil fosfatidiletanolamina
RLU	Unidad relativa de luminiscencia
RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEL	Lazo extracelular pequeño
Sf	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SL	Lazo Stem
SPP	Peptidasa péptido señal
SR-B1	Receptor Scavenger clase B tipo 1
TAE	Tampón Tris, ácido acético, EDTA
TEM	Tetraspanina
TEMED	N,N,N',N' tetrametiletilendiamina
TMD	Transmembrana
Tni	<i>Trichoplusia ni</i>
Tris	Tris (hidroximetil)aminometano
UTR	Región no codificante
UV	Ultravioleta
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
VLP	<i>Virus like particles</i>



ENGLISH SUMMARY

Introduction

The Hepatitis C Virus is the main cause of death due to hepatic complications derived from the infection. The number of deceased people can reach 350 000 every year. Until now, the genotypic variety and the difficulty of working with the isolated virus or its constituent proteins, has made impossible to develop an effective vaccine against HCV. Advances in the treatment of the disease have been achieved in the last years through the advent of new drugs able to reach a degree of cure above 96% for patients infected with genotype 1, leaving the rest of genotypes excluded from these therapies.

As a *Flaviviridae* virus, the envelope glycoproteins E1 and E2 are the main responsible for recognition of receptors and entry into target cells. E2 seems to be the leading protein and E1 the companion one, functioning as a chaperone for the correct folding of E2, acting both of them as a functional heterodimer essential for the virus cycle. However, the exact roles of E1 in the recognition and fusion processes of the E1-E2 complex remain to be determined. In this sense, there is a controversy about the assignment of the fusion protein. Regarding this point, several fusogenic peptides have been described for E2, but also one hydrophobic region of E1, between residues 268 and 292, has been proposed as a fusogenic peptide which could contribute to the first stages of the infective cycle.

On the other hand, it is known the need to obtain a stable heterodimer between E1 and E2 to produce infective particles able to enter in target cells. Moreover, the mechanism leading the interactions between E1 and E2 has not yet been well defined. Until now, any covalent interaction between E1 and E2 glycoproteins has not been described, but it has been postulated the necessity of specific residues in the transmembrane domains (TMD) of both proteins to form functional heterodimers. Although to date an exhaustive characterization of the E1 and E2 TMD has not been performed, it has been described the implication of different residues and motifs in the interaction between both of them. These are 1) the Lys in position 370 of E1 and the Asp in position 728 of E2 that could lead to the formation of a salt bridge between them, 2) the presence of a GXXXG sequence between residues 354 and 358 of E1 that has been defined as a dimerization motif and 3) the Arg residue at position 730 of E2 which could be implicated in another electrostatic interaction.

Objectives

The main objective of this thesis has been to gain new clues of the molecular biology of the HCV E1-E2 complex. Particularly, two aspects have been addressed:

1) The implication of the putative E1 268-292 fusogenic peptide in the E1-E2 properties. For this purpose two different mutant constructions lacking this fragment have been used: a) the chimera E2E1 Δ 268-292 containing both E1 and E2 ectodomains has been characterized in terms of its structural, antigenic and membrane destabilization properties and b) the C₁₃₂E1 Δ 268-292E2 HCV pseudoparticles were analyzed in terms of their entry capacity in Huh7 cells.

2) The characterization of the E1 and E2 transmembrane domains. Different point mutations in the transmembrane domains corresponding to the residues previously mentioned have been designed to characterize: a) the insertion of the TMD into the membrane bilayer, b) the interaction between the E1 and E2 TMD and c) the entry capacity in Huh7 cells of the HCVpp containing the mutations.

Results and discussion

1) Implication of the putative E1 268-292 fusogenic peptide in the E1-E2 properties.

The recombinant chimeric mutant protein (E2E1 Δ 268-292) was expressed in *baculovirus*-infected High Five insect cells and the secreted protein was purified with a high yield from the extracellular medium by Ni²⁺-nitrilotriacetic acid-agarose chromatography following the methodology previously described for the intact chimera E2₆₆₁E1₃₄₀ (E2E1). All the spectroscopic features such as dichroism and fluorescence spectra and the oligomerization properties revealed that the protein is correctly folded and has the structure of a native protein with the same properties than the complete chimera E2E1. Antigenic studies revealed that both, the complete chimera and the mutated one have the same ability to be recognized by antibodies present in HCV positive sera. These results allowed us to compare both proteins in terms of membrane destabilizing properties using vesicles formed by acidic phospholipids (PG). The results of these experiments revealed that deletion of the region 268-292 did not affect the aggregation and lipid mixing processes. However, when leakage assays were compared, a drastic reduction of the capacity to disrupt the membrane was observed; a 10 times higher protein concentration is needed to attain results comparable to those of the entire chimera.

The role of the deletion on the function of the envelope proteins was studied by obtaining HCVpp which will give us information about the involvement of the deleted peptide in the entry mechanism. Both E1 and E2, and also the E1 deleted mutant, were incorporated into the pseudoparticles to a similar level. However, HCVpp C₁₃₂E1_{Δ268-292}E2 have an almost complete impaired ability to infect Huh7 cells. This diminution could be due to the reduced capacity of the mutant protein to disrupt the membrane as revealed by the leakage assay. Hence, we can conclude that the region 268-292 of E1 is a fusogenic peptide that does not interfere in the first steps of the fusion process but it is required for more advanced stages acting together with the fusogenic peptides of E2.

2) Characterization of the E1 and E2 transmembrane domains

With the aim of characterizing the transmembrane domains of the envelope glycoproteins E1 and E2, as proposed in the second objective, we have used different methodologies in order to study three different properties: a) ability of each single E1 and E2 TMD to integrate in a lipid bilayer by the insertion in the membrane of the modified Lep protein, using an *in vitro* translation-glycosylation system b) ability to interact between E1 and E2 transmembrane domains by reconstitution of the Venus green fluorescent protein in HeLa cells and c) ability to form functional heterodimers by evaluating the capacity of the mutant HCVpp to enter in hepatoma cells. We have set up these methodologies and checked the corresponding properties for the natural E1 and E2 anchoring domains.

Thus, several point mutants, designed from the critical residues above described, were constructed and their insertion, heterodimerization, and entry capabilities were compared with those of the parental E1 and E2. The results obtained revealed the capacity of all the mutants to be inserted into the lipid bilayer to a greater or lesser degree. The removal of the salt bridge affected the E1-E2 interaction mostly when the charged residue that has been substituted by alanine is located in E2 (D728), but in the rest of the mutants, different degree of interaction remained. These results indicated that the formation of the salt bridge is not necessary for the interaction between the E1 and E2 transmembrane domains. However, mutants HCVpp having disrupted this electrostatic interaction, abolish the entry capacity of the pseudoparticles. Moreover, the restoration of the salt bridge by permutation of charges recovered the infectivity of the HCVpp. These results revealed that the maintenance of the salt bridge in the lipid bilayer is essential to ensure specific interactions between transmembrane domains that lead to functional heterodimers. On the other hand, the charged residue R730 in E2, did not contribute to any electrostatic interaction, being only necessary the presence of a bulky residue at that

position for the specific interaction between transmembrane domains, as observed with the entry capacity of the corresponding mutant R730W HCVpp.

The use of a modified protocol of the *in vitro* translation-glycosylation system with proteins derived from the *Leader peptidase* (Lep), used to study the insertion of the TMD, has enabled us to establish the first residues of the E1 and E2 in the lipid bilayer. The obtained results revealed that, in the case of E1, this aminoacid corresponds to the Ile 359, 6 residues behind the one defined theoretically in the bibliography. In the case of E2, the first residue defined, agrees with the theoretical. The new location of the first residue in E1 calls in question the importance of the sequence GXXXG, between residues 354 and 358, defined as a heterodimerization motif, in the interaction between E1 and E2. In fact, different studies using a short E1 TMD lacking this sequence revealed only a 15% diminution of the interaction between E1 and E2. The simultaneous removal of this motif and the salt bridge did not abolish the heterodimer formation, so there must be another mechanism of interaction. Hence, there must be, at least three factors that regulate the correct formation of functional heterodimers: the salt bridge formation between residues K370 and D728, the GXXXG motif and some unspecific hidrofobic interactions not well defined yet.

Conclusions

Based on the first objective, the following conclusions can be obtained:

1. The chimeric glycoprotein E2E1_{Δ268-292} has been correctly produced using the *baculovirus*-insect cell system. This protein has almost the same structural and antigenic properties than the original chimera E2E1.
2. The membrane destabilization studies performed with E2E1_{Δ268-292} reveal that neither aggregation nor lipid mixing are affected by the deletion of this peptide but ten times fold of mutant protein is needed to reach the levels of leakage observed with the natural chimera E2E1.
3. The HCV pseudoparticles lacking the E1 fusogenic peptide, C₁₃₂E1_{Δ268-292}E2, have an almost complete impaired capacity of entry in Huh7 cells.

These results reveal that the region 268-292 of E1 is absolutely required to obtain functional pseudoparticles and must be involved in late stages of the fusion process.

Based on the second objective, the characterization of the transmembrane domains, we can conclude that:

4. All the mutants generated for the transmembrane domains of E1 and E2 are able to insert into the lipid bilayer.

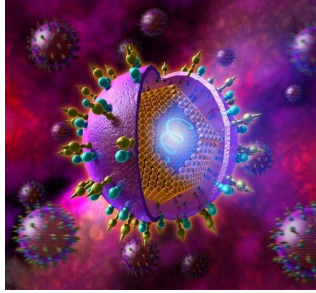
5. The salt bridge formed by K370 and D728 is indispensable to produce the specific interaction that leads to functional heterodimers able to enter into the target cells.

6. The first transmembrane residue for E1 is Ile359, 6 residues after the W353 described in the bibliography.

7. The sequence GXXXG, is responsible for a 15% of interaction between both transmembrane domains. Thus, although it participates in the interaction process, is not its main component.

These results reveal that there are two specific interaction motifs between E1 and E2 transmembrane domains, the salt bridge and the GXXXG sequence, remaining a third unspecific interaction component, probably of hydrophobic nature.

These studies demonstrate, therefore, the diversity of mechanisms that have the virus to maintain its spread and allow us to establish a model for the general study of membrane-anchored proteins having biological functions.



RESUMEN

Introducción

El virus de la hepatitis C es la principal causa de muerte debida a complicaciones hepáticas derivadas de su infección, con 350 000 personas fallecidas al año. Hasta el momento, la variedad genotípica y la dificultad para trabajar con el virus aislado o sus proteínas constituyentes ha hecho imposible el desarrollo de una vacuna eficaz contra el HCV. En los últimos años se han llevado a cabo grandes avances en el tratamiento de la enfermedad con el desarrollo de nuevos fármacos capaces de alcanzar un nivel de curación superior al 96% para pacientes infectados con el genotipo 1, quedando el resto excluidos de estas terapias.

El HCV pertenece a la familia *Flaviviridae*, y como tal, las glicoproteínas de la envoltura, E1 y E2, son las principales responsables del reconocimiento de receptores y la entrada en las células diana. E2 parece ser la proteína principal, mientras que E1, la proteína acompañante, funcionaría como una chaperona para el correcto plegamiento de la primera. Ambas interaccionan para dar lugar a un heterodímero funcional esencial para el ciclo viral. Sin embargo, la implicación de E1 en el reconocimiento y la fusión del complejo E1-E2 aún no ha sido determinada. En este sentido, existe una controversia sobre cuál es la proteína fusogénica. Así, diversos péptidos fusogénicos han sido descritos para E2, pero también ha sido propuesta una región hidrofóbica en E1, comprendiendo los residuos 268-292, como un péptido fusogénico que podría contribuir a las primeras etapas del ciclo infectivo.

Por otro lado, se ha descrito la necesidad de obtener un heterodímero estable entre E1 y E2 para producir partículas infecciosas capaces de entrar en las células diana. El mecanismo que permite la interacción entre ambas no ha sido establecido. Hasta el momento no se ha descrito la presencia de interacciones covalentes entre E1 y E2 pero se ha postulado la necesidad de residuos específicos en los dominios transmembrana (TMD) de ambas proteínas para formar heterodímeros funcionales. Aunque hasta la fecha no se ha llevado a cabo una caracterización exhaustiva de los TMD de E1 y E2, se ha descrito la implicación de diferentes residuos y motivos de secuencia en la interacción entre ambos TMD: 1) la Lys en posición 370 de E1 y el Asp en posición 728 de E2 podrían dar lugar a la formación de un puente salino entre ellos, 2) el motivo GXXXG entre los residuos 354 y 358 ha sido definido como un motivo de heterodimerización y 3) la Arg en posición 730 de E2 podría estar implicada en interacciones de tipo electrostático.

Objetivos

El principal objetivo de esta tesis ha sido obtener nuevas claves para el conocimiento de la biología molecular del complejo E1-E2 del HCV. Particularmente se estudian dos aspectos:

1) La implicación del péptido 268-292 de E1 en las propiedades del complejo E1-E2. Para este propósito utilizan dos construcciones carentes de este fragmento: a) la quimera E2E1 Δ 268-292 que contiene los ectodominios de E1 y E2, caracterizada en cuanto a sus propiedades estructurales, antigénicas y de desestabilización de sistemas modelo de membrana y b) las pseudopartículas de HCV con la construcción C₁₃₂E1 Δ 268-292E2, analizadas en cuanto a su capacidad de entrada en células Huh7.

2) La caracterización de los dominios transmembrana de E1 y E2. Se diseñaron diferentes mutantes puntuales en los segmentos transmembrana con el fin de caracterizar: a) la inserción de los TMD en la bicapa lipídica, b) la interacción entre los TMD de E1 y E2 y c) la capacidad de entrada en células Huh7 de las HCVpp mutantes.

Resultados y discusión

1) Implicación del péptido fusogénico descrito para E1 (residuos 268-292) en las propiedades del complejo E1-E2.

La proteína recombinante mutante (E2E1 Δ 268-292) fue expresada en el sistema de *baculovirus*-células de insecto y purificada a partir del medio extracelular por cromatografía de afinidad en una columna de Ni²⁺-NTA siguiendo la metodología descrita para la quimera natural E2₆₆₁E1₃₄₀ (E2E1). Tanto las propiedades estructurales, espectros de dicroísmo circular y de fluorescencia, como las propiedades de oligomerización revelaron que la proteína está correctamente plegada y tiene la estructura de la quimera nativa E2E1. Los estudios antigénicos mostraron que tanto la quimera nativa como la mutante presentan la misma capacidad para ser reconocidas por anticuerpos presentes en sueros de pacientes positivos para HCV. Estos resultados nos permitieron comparar ambas proteínas en términos de desestabilización de membranas usando para ello vesículas compuestas por fosfolípidos ácidos (PG). El resultado de estos experimentos reveló que la delección de la región 268-292 no afecta ni a la agregación ni al proceso de mezcla de lípidos. Sin embargo, cuando se llevan a

cabo los ensayos de liberación de contenidos acuosos, se observó una reducción de la capacidad de distorsionar la membrana, necesitándose una concentración de proteína 10 veces mayor para conseguir resultados comparables a los de la quimera completa.

El papel de la delección en la función de las proteínas de la envoltura se estudió mediante la obtención de HCVpp que aportan información sobre la implicación del péptido delecionado en el mecanismo de entrada. Tanto E1 como E2, así como la proteína E1 delecionada, fueron incorporadas en las pseudopartículas en niveles similares. Sin embargo, las HCVpp conteniendo C₁₃₂E1_{Δ268-292}E2 tienen una capacidad prácticamente nula de infectar células Huh7. Esta disminución se puede deber a la capacidad reducida del mutante para distorsionar la membrana como revelan los ensayos de liberación de contenidos acuosos. Por lo tanto, podemos concluir que la región 268-292 de E1 es un péptido fusogénico que no interfiere en las primeras etapas del proceso de fusión pero que es requerido en etapas más avanzadas actuando conjuntamente con péptidos fusogénicos de E2.

2) Caracterización de los dominios transmembrana de E1 y E2.

Con objeto de caracterizar los dominios transmembrana de las glicoproteínas de la envoltura E1 y E2, como se ha propuesto en el segundo objetivo, hemos utilizado diferentes metodologías que nos permiten estudiar diferentes propiedades: a) capacidad de cada TMD para integrarse en la bicapa lipídica mediante la inserción en la membrana de la proteína Lep modificada con el inserto de interés, usando un sistema de traducción- glicosilación *in vitro*, b) capacidad de interacción entre diferentes TMD de E1 y E2 mediante la reconstitución de la proteína verde fluorescente Venus en células HeLa y c) formación de heterodímeros funcionales evaluando la capacidad de las HCVpp mutantes para entrar en células de hepatoma. Hemos puesto a punto estas metodologías y comprobado las correspondientes propiedades de los dominios de anclaje de E1 y E2.

Se han diseñado diferentes mutantes puntuales para los residuos críticos descritos previamente. Su capacidad de inserción, heterodimerización y entrada en células diana ha sido comparada con la de las glicoproteínas nativas E1 y E2. Los resultados obtenidos revelan la capacidad de todos los mutantes para insertarse, en mayor o menor medida, en la bicapa lipídica. La eliminación del puente salino afecta a la interacción del complejo E1-E2 en mayor medida cuando el residuo sustituido por alanina es el presente en E2 (D728), manteniéndose en el resto de mutantes diferentes grados de interacción. Estos resultados indican que la formación del puente salino no es necesaria para la interacción entre los dominios transmembrana de E1 y E2. Sin embargo, mutantes de pseudopartículas en los que se rompe esta interacción electrostática pierden la capacidad de entrada en las células diana. Además, la

recuperación del puente salino por permutación de cargas entre ambos dominios es capaz de recobrar la infectividad de las HCVpp. Estos resultados revelan que el mantenimiento del puente salino en la bicapa lipídica es esencial para asegurar la formación de heterodímeros funcionales. Por otro lado, el residuo cargado R730 en E2, no contribuye a ningún tipo de interacción electrostática, siendo sólo necesaria la presencia de un residuo voluminosos en esa posición para la interacción específica entre los dominios transmembrana tal y como se observa por el mantenimiento de la capacidad de entrada del mutante de HCVpp R730W.

La utilización de un protocolo modificado del sistema de traducción-glicosilación *in vitro* con proteínas derivadas de la *Leader peptidase* (Lep) permitió fijar el establecimiento de los primeros residuos de los dominios transmembrana de E1 y E2 dentro de la bicapa. Los resultados obtenidos revelan que, en el caso de E1, la primera posición corresponde al aminoácido Ile 359, 6 residuos por detrás del definido teóricamente en la bibliografía. En el caso de E2, el primer residuo definido, concuerda con el teórico. La nueva localización del primer residuo de E1 cuestiona la importancia de la secuencia GXXXG, localizada entre los residuos 354-358 y definida como un motivo de heterodimerización, en la interacción entre E1 y E2. De hecho, diferentes estudios usando un TMD acortado para E1 revelaron una pérdida de interacción con E2 de tan sólo el 15%. La eliminación simultánea de este motivo y del puente salino no suprimió totalmente la formación de heterodímeros por lo que debe existir otro motivo de interacción. De hecho, debe haber al menos tres factores que regulen la correcta formación de heterodímeros funcionales: la formación de un puente salino entre los residuos K370 y D728, la presencia del motivo GXXXG y un componente de interacciones hidrofóbicas inespecífico no descrito hasta el momento.

Conclusiones

Con base en el primer objetivo se pueden postular las siguientes conclusiones:

1. La glicoproteína quimérica E2E1_{Δ268-292} ha sido producida correctamente usando el sistema de *baculovirus*-células de insecto. Esta proteína tiene las propiedades estructurales y antigénicas propias de la quimera completa E2E1.
2. Los estudios de desestabilización de membranas llevados a cabo con la proteína E2E1_{Δ268-292} revelaron que ni la agregación ni la mezcla de lípidos se ven afectadas por la delección del péptido pero, es necesaria una concentración de proteína 10 veces mayor para alcanzar niveles de liberación de contenidos acuosos comparables a los de la quimera natural E2E1.
3. Las pseudopartículas de HCV carentes del péptido fusogénico en E1, C₁₃₂E1_{Δ268-292}E2, pierden casi totalmente la capacidad de entrar en células diana Huh7.

Estos resultados revelan que la región 268-292 de E1 es absolutamente necesaria para la obtención de pseudopartículas funcionales y debe estar implicada en etapas tardías del proceso de fusión.

Con base en el segundo objetivo, la caracterización de dominios transmembrana, podemos establecer las siguientes conclusiones:

4. Todos los mutantes generados para los dominios transmembrana de E1 y E2 son capaces de insertarse en la bicapa lipídica.

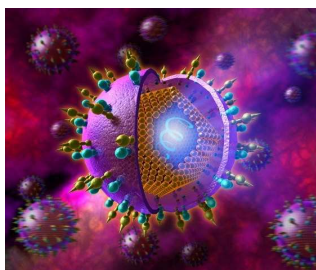
5. El puente salino formado por los residuos K370 y D728 es indispensable para producir interacciones específicas que den lugar a heterodímeros funcionales capaces de entrar en las células diana.

6. El primer residuo transmembrana de E1 es la Ile359, 6 residuos por detrás del W353 descrito en la bibliografía.

7. La secuencia GXXXG es responsable del 15% de la interacción entre ambos dominios transmembrana. A pesar de participar en el proceso de interacción no es un componente principal de la misma.

Estos resultados revelan la presencia de dos interacciones específicas entre los dominios transmembrana de E1 y E2, el puente salino y la secuencia GXXXG existiendo un tercer componente de interacción inespecífica probablemente de naturaleza hidrofóbica.

Este trabajo demuestra la diversidad de mecanismos que presentan los virus para mantener su capacidad de propagación y nos permite establecer un modelo general de estudio para proteínas ancladas a membrana con funcionalidad biológica.



INTRODUCCIÓN

1. EL VIRUS DE LA HEPATITIS C

1.1. PERSPECTIVA GENERAL

El virus de la hepatitis C (HCV, del inglés “Hepatitis C Virus”) está descrito como la principal causa de hepatitis aguda y enfermedad hepática crónica, incluyendo cirrosis y cáncer hepático, así como la causa más frecuente de trasplante hepático en América, Europa y Japón [1]. Fue identificado por primera vez por Choo y *col.* en 1989 [2]. Antes de este hecho se había definido como “hepatitis no A no B” debido a que, siendo de naturaleza infecciosa y causando inflamación hepática, carecía de las características propias de las hepatitis A y B.

Según la Organización Mundial de la Salud, en la actualidad hay, en todo el mundo, entre 170 y 200 millones de personas infectadas por el virus de la hepatitis C, aproximadamente un 3% de la población, apareciendo cada año entre 3 y 4 millones de nuevos casos. Un número considerable de esas personas con infección crónica desarrollarán cirrosis o cáncer de hígado. Anualmente mueren más de 350 000 personas por enfermedades hepáticas relacionadas con el HCV.

Además, el virus puede permanecer silente durante décadas, por lo que en los próximos años podría multiplicarse el número de personas con hepatitis C crónica que en este momento desconocen que están infectadas. La forma más común de contagio es el contacto directo con sangre infectada, principalmente mediante transfusiones de sangre no testada y por reutilización de agujas y jeringuillas que no han sido adecuadamente esterilizadas. Un 75-85% de las infecciones por HCV se hacen crónicas, y de éstas, aproximadamente, el 10-20% desarrolla cirrosis y un 1-5% carcinoma hepatocelular en un periodo de 20 a 30 años [3]. Aproximadamente un 15-45% de las personas infectadas eliminan el virus espontáneamente en un plazo de seis meses, sin necesidad de tratamiento alguno.

Mediante el análisis comparativo de las secuencias genómicas de virus aislados en diferentes zonas geográficas se han podido identificar hasta 7 genotipos distintos del HCV, denominados del 1 al 7 según el orden de descubrimiento. Los distintos genotipos difieren entre sí en un 30-35% de la secuencia. Asimismo, cada uno de estos genotipos está dividido en subtipos, los cuales difieren entre sí en un 20-25% de la secuencia y son identificados mediante letras, por ejemplo, 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, etc. Esta variabilidad supone una complicación adicional [4].

El tratamiento estándar en la actualidad frente a la infección por el HCV es la terapia combinada con ribavirina, un agente antiviral inespecífico, y el interferón- α

(IFN- α), que activa el sistema inmune e impide la replicación viral. Sin embargo, sólo un 30-40% de los pacientes responde a esta terapia [5], y la eficacia del tratamiento depende del genotipo del virus, siendo del 50% para los pacientes con genotipo 1, que es el más prevalente (figura 1). Además, el tratamiento es muy prolongado y puede causar serios efectos secundarios, desde fatiga y síntomas típicos de la gripe, hasta anemia y depresión severa.

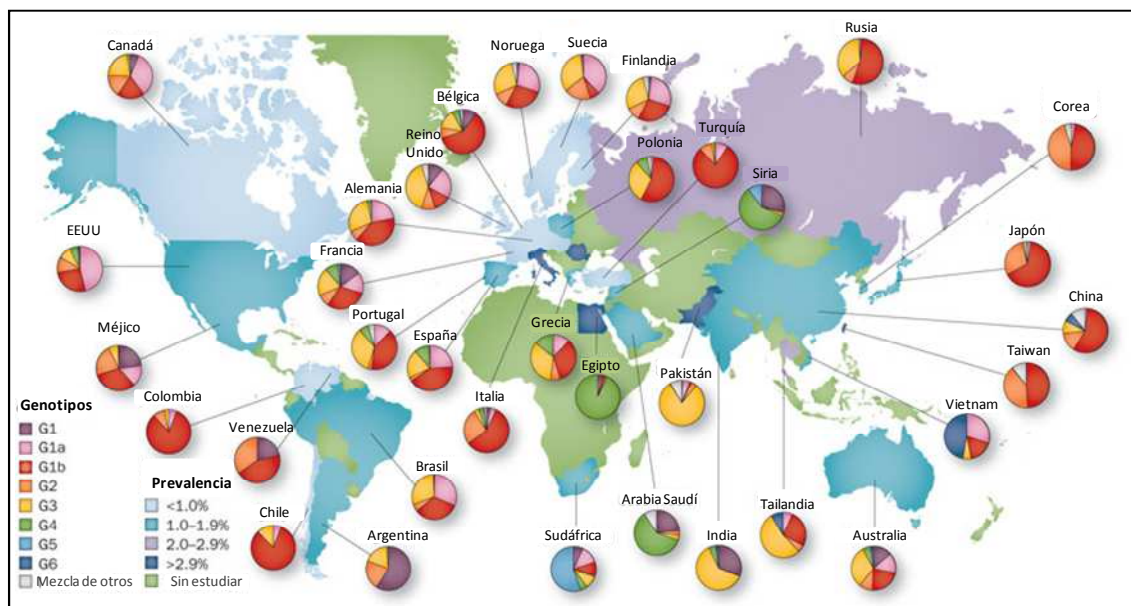


Figura 1. Expansión del HCV en el mundo. Representación de la prevalencia del virus en diferentes países así como la distribución de genotipos en cada uno de ellos. Adaptada de [6].

En los últimos años, están siendo comercializados nuevos fármacos antivirales. El Boceprevir (Merck) y el Telaprevir (Vertex Pharmaceuticals), ambos inhibidores de la proteasa viral NS3/4A, han sido diseñados para atacar específicamente al genotipo 1 del virus, que representa el 60% de las infecciones globales, con una tasa de respuesta de hasta el 80% [7-9]. Basándose en el mismo mecanismo de acción, se ha empezado a comercializar el Simeprevir (Janssen) que parece ser más efectivo y tener menos efectos secundarios, siendo administrado mediante una única cápsula de 150 miligramos una vez al día durante 12 semanas. Se puede administrar en una pauta de triple terapia (con interferón pegilado y ribavirina), tanto en pacientes que nunca han recibido tratamiento previo como en los que ha fracasado el tratamiento anterior. En nuevos intentos por abordar diferentes mecanismos de acción se desarrolló el Daclatasvir (Bristol-Myers Squibb) bajo el nombre de Daklinza. Este fármaco actuaría como inhibidor de la proteína NS5A implicada en la formación del complejo de replicación. Los ensayos clínicos realizados hasta la fecha han dado un resultado favorable, por lo que su uso ha sido aprobado tras ser evaluado por la Agencia Europea

de Medicamentos y la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos.

Recientemente, el Ministerio de Sanidad Español ha aprobado, además la utilización de Sofosbuvir, comercializado como Sovaldi por la farmacéutica Gilead Science. En este caso, el mecanismo de acción supone el bloqueo de la polimerasa NS5B impidiendo la replicación del RNA viral. Los resultados obtenidos en los exhaustivos ensayos clínicos demuestran que se pueden conseguir altas tasas de curación en todos los genotipos y con un periodo de tratamiento reducido, de 12-24 semanas. Para el caso del genotipo 1 sería necesario el co-tratamiento con interferón y ribavirina mientras que para los genotipos 2 y 3 se puede suprimir el uso de interferón lo cual disminuye los efectos secundarios [10]. Sin embargo, la comercialización de este medicamento está generando polémica, ya que se trata de un fármaco altamente costoso. El tratamiento de 12 semanas supone un gasto de entre 50 000 y 60 000 euros por paciente lo cual es difícilmente asumible para un sistema de salud público. El alto coste viene fijado por la farmacéutica productora basándose en la alta tasa de curación (más del 96%) y por la inversión en su desarrollo.

Como ya se ha comentado, estas drogas suplementarán, pero no reemplazarán, el tratamiento estándar. En los ensayos en fase III, cada droga, en combinación con la terapia estándar, aumenta hasta el 70% la tasa de pacientes curados con genotipo 1, reduciéndose además el tiempo de tratamiento, en algunos casos hasta la mitad. La dificultad reside en la diversidad que existe entre los virus que circulan dentro de un mismo individuo ya que continuamente se genera una elevada variación de secuencias, debido a que la polimerasa viral carece de capacidad correctora de errores, lo cual puede llevar a la resistencia del virus a los fármacos. Por ello, sería necesaria una terapia con múltiples drogas que impidieran al virus mutar para hacerse resistente frente a todas, lo que conllevaría más efectos secundarios derivados del tratamiento. De esta forma, la mayoría de los investigadores y los expertos en salud pública coinciden en que, además de mejorar los tratamientos, la solución última sería la vacuna frente al HCV, ya que de otra manera siempre existirán infecciones que provengan de lugares en los que no se dispone de terapias frente al virus.

No obstante, el desarrollo de la vacuna es un reto complicado que aún no se ha conseguido tras más de dos décadas de investigación. Las investigaciones se han visto limitadas por la falta de un modelo animal apropiado y de un sistema de cultivo celular *in vitro* que sea capaz de reproducir el ciclo replicativo completo del virus, incluyendo la producción de partículas virales infecciosas [11-13].

1.2. ESTRUCTURA DEL HCV

El HCV se encuadra en el género *hepacivirus*, dentro de la familia *Flaviviridae* [14]. Esta clasificación se ha realizado basándose en el perfil de hidrofobicidad y la homología de secuencia con los otros dos géneros incluidos en esta familia: los flavivirus (entre los que se encuentran virus humanos tales como el virus de la fiebre amarilla y el virus del dengue) y los pestivirus (que incluyen el virus de la diarrea bovina y el virus de la peste porcina, entre otros) además de otros virus todavía sin clasificar como GBV-A y GBV-C (Virus G. Barker)[15, 16]. Aunque tradicionalmente el HCV ha sido considerado el único miembro de este género *hepacivirus*, en el año 2005, se incluyó el virus GBV-B, un virus hepatotrópico que infecta tamarinos [17].

En el año 2011, Kapoor y *col.* identificaron un homólogo canino del HCV en muestras de mucosas respiratorias de perros [18]. Este *hepacivirus* canino es el primero aislado de un animal no primate y es el más cercano filogenéticamente al HCV descrito hasta la fecha. Posteriormente se han encontrado virus similares a este *hepacivirus* canino en caballos.

El HCV es un virus con envoltura que infecta a humanos y a chimpancés, lo que lo diferencia del resto de flavivirus. La superficie del HCV está constituida por una envoltura de naturaleza lipídica en donde se encuentran las glicoproteínas estructurales E1 y E2, las cuales juegan un papel fundamental en las primeras etapas del ciclo infectivo del HCV. La bicapa lipídica recubre la nucleocápsida viral, formada por la proteína C, y dentro de ésta se aloja el genoma del HCV, constituido por una cadena simple de RNA (figura 2).

El HCV ha sido visualizado por técnicas convencionales de microscopía electrónica de transmisión, observándose dos tipos de partículas: partículas de 30-35 nm de diámetro correspondientes a las nucleocápsidas y partículas de 50-60 nm que parecen ser los viriones infecciosos [12, 19-22]. Hasta la fecha no se han obtenido imágenes de alta resolución del virus, ni se conoce la estructura tridimensional completa de las proteínas de la envoltura E1 y E2.

Por analogía con otros miembros de la familia *Flaviviridae*, se creía que el HCV podría adoptar una estructura icosaédrica; sin embargo, datos recientes sugieren que presenta una estructura pleomórfica (presenta dos o más estructuras a lo largo de su ciclo de vida), con las glicoproteínas E1 y E2 incrustadas en la membrana lipídica derivada del retículo endoplásmico de la célula hospedadora [23, 24].

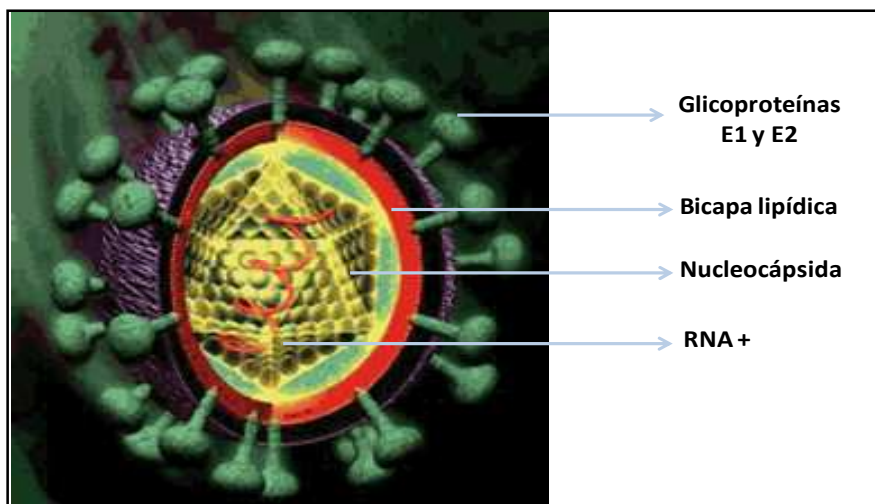


Figura 2. Estructura de la partícula viral del HCV. Modelo tridimensional del HCV. Los viriones constan de una envoltura lipídica, donde se encuentran las glicoproteínas E1 y E2. Esta envoltura recubre la nucleocápsida formada por la proteína C, en cuyo interior se encuentra el genoma viral.

La densidad del HCV circulante en la sangre de los pacientes es muy heterogénea, ya que puede encontrarse en su forma libre o asociado con lipoproteínas de alta, baja o muy baja densidad o con inmunoglobulinas [25-30]. Diversos estudios sugieren que las partículas asociadas a lipoproteínas representan las especies de mayor infectividad, mientras que los viriones libres presentarían menor nivel de infectividad [26, 31].

1.3. EL GENOMA VIRAL

El HCV presenta un genoma de unos 9600 nucleótidos, constituido por una cadena sencilla de RNA de polaridad positiva. Este genoma está flanqueado por las regiones 5' y 3' no codificantes o UTR (del inglés "untranslated region") implicadas en las etapas de replicación y traducción [32-36], con una estructura secundaria altamente conservada. El genoma contiene un único marco de lectura abierto que codifica una poliproteína de unos 3000 aminoácidos [37, 38], la cual es posteriormente procesada por una combinación de proteasas virales y celulares para originar las proteínas estructurales (C, E1, E2 y p7) y no estructurales del virus (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) (figura 3).

La región 5'-UTR es la secuencia más conservada de todo el genoma del HCV. Contiene 341 nucleótidos y está constituida por cuatro dominios altamente estructurados en forma de lazos que se enumeran de I a IV [39] (figura 4). Los dominios II, III y IV, junto con los primeros 12-30 nucleótidos de la región que codifica la proteína C, constituyen el sitio interno de entrada del ribosoma, IRES (del inglés

“Internal Ribosome Entry Site”) [40]. A través de una interacción directa con el elemento IRES, la subunidad 40S del ribosoma es reclutada en las proximidades del codón de inicio, colocándose directamente el codón AUG en el sitio P del ribosoma, eliminando el requerimiento de una estructura 5'CAP y la exploración del ribosoma previas a la iniciación de la traducción [41]. Las estructuras de RNA por delante del lazo IV son esenciales para la actividad traduccional [40, 42, 43], pero el lazo I (nucleótidos 5 a 20) parece tener una acción opuesta, ya que su delección aumenta la actividad del IRES *in vivo* e *in vitro* [40, 42].

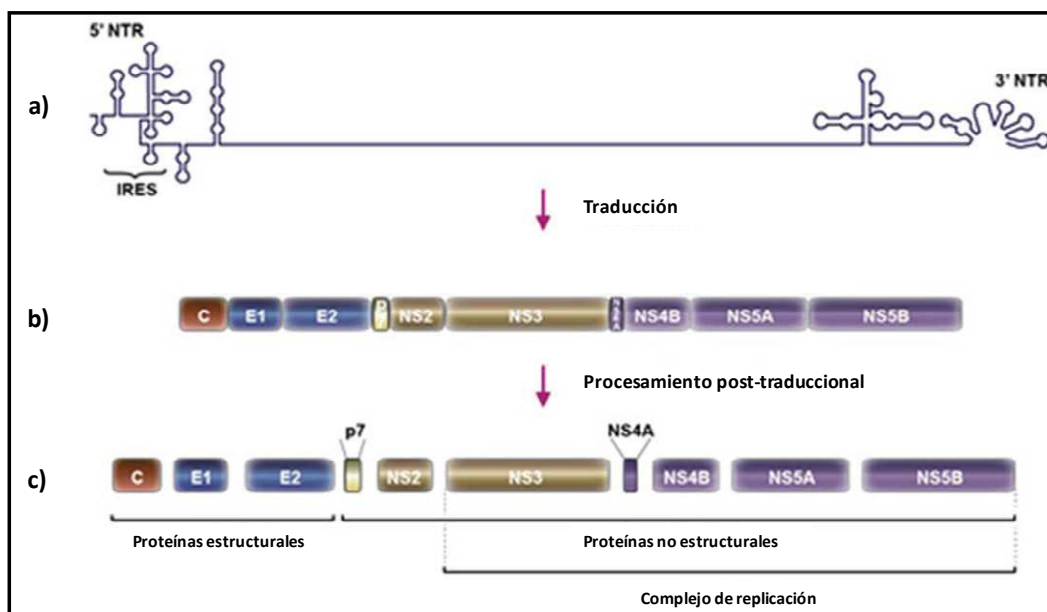


Figura 3. Esquema de la organización genómica del HCV y las proteínas virales. a) Representación lineal del genoma viral con las estructuras de las regiones no traducidas 5' y 3'. b) Organización de las proteínas en el precursor poliprotéico. c) Proteínas virales tras su procesamiento por las diferentes proteasas virales y celulares. Se indica también su clasificación según su función. Adaptada de [44].

Se ha descrito que el micro-RNA-122 (miRNA-122, específico de hígado) se une al extremo 5' promoviendo la replicación y la traducción del virus [45, 46]. Además, el secuestro de miRNA-122 mediante oligonucleótidos antisentido reduce la replicación del HCV tanto en cultivo celular como *in vivo*, lo que sugiere que podría ser una diana para la terapia antiviral [47].

La región 3'-UTR, dividida en tres horquillas SL (del inglés “Stem Loop”) (figura 4), está compuesta por una secuencia poco conservada de aproximadamente 40 nucleótidos, un tramo interno de longitud variable de poli U/UC y una secuencia altamente conservada de 98 nucleótidos, de los cuales los 45 últimos forman una estructura en forma de lazo muy estable denominada Tallo-X [32, 48-50]. Varios estudios sugieren que, además de jugar un papel importante en la replicación del RNA,

la región 3'-UTR, y en particular el Tallo-X, estabiliza el RNA y aumenta la traducción en ensayos *in vitro* y en células transfectadas [51, 52]. El alto porcentaje de identidad en esta región entre los distintos genotipos del HCV sugiere que podría ser importante para la iniciación de la síntesis de la hebra negativa, ya que los RNAs del HCV que no poseen esa región son incapaces de replicarse en chimpancés [53].

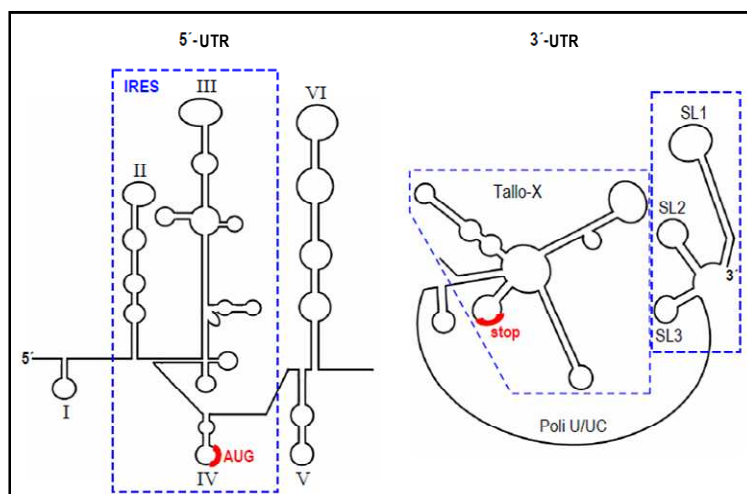


Figura 4. Estructura secundaria de las regiones 5'-UTR y 3'-UTR. En rojo se muestran los sitios de iniciación y terminación de la traducción [40, 54].

1.4. PROTEÍNAS VIRALES

El marco de lectura abierto del HCV contiene entre 9024 y 9111 nucleótidos, dependiendo del genotipo, y codifica una poliproteína cuyo procesamiento postraducciona genera 10 proteínas virales: 3 proteínas estructurales (C, E1 y E2), la proteína p7 y 6 proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B).

El procesamiento proteolítico de la poliproteína es llevado a cabo por cuatro proteasas, dos virales y dos celulares. La peptidasa señal, enzima celular presente en el retículo endoplásmico (RE), parece ser la principal responsable del procesamiento de las proteínas estructurales en los sitios C/E1, E1/E2, E2/p7 y p7/NS2. Además, se produce una segunda digestión en la región carboxilo terminal de la proteína C por la peptidasa péptido señal (SPP). El sitio NS2/NS3 es procesado autocatalíticamente por una actividad autoproteasa localizada en NS2, mientras que el resto de las proteínas no estructurales (NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) se origina por acción de la serín-proteasa viral NS3 y su cofactor NS4A. En la figura 5 se muestran los cortes llevados a cabo por cada una de las proteasas así como la supuesta estructura y la disposición de cada una de las proteínas en la membrana del retículo endoplásmico.

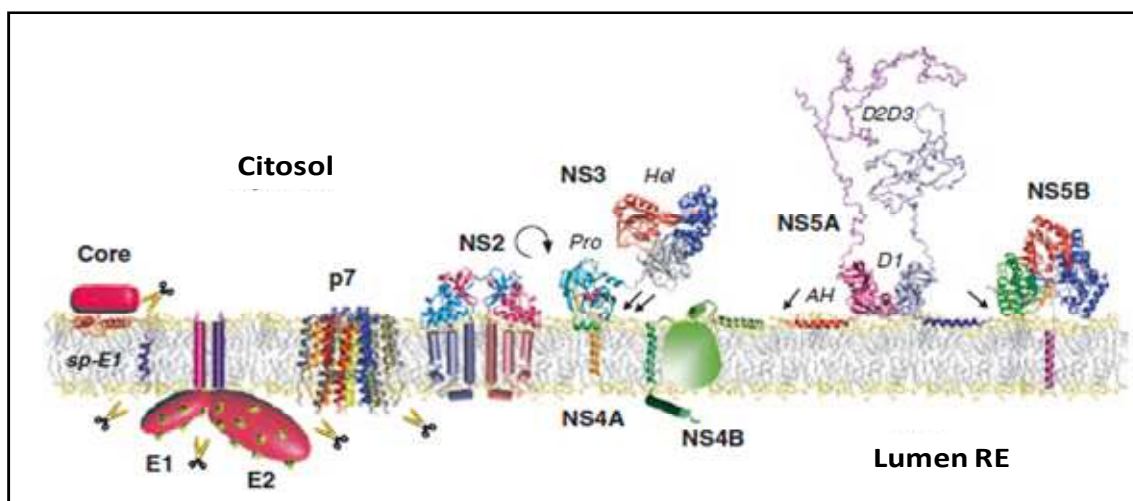


Figura 5. Representación esquemática de la disposición de las proteínas del virus de la hepatitis C en la membrana del retículo con sus dominios así como el procesamiento proteolítico llevado a cabo. Sp-E1 representa a la peptidasa péptido señal (SPP), las tijeras representan a la peptidasa señal celular, se muestra el corte autoproteolítico de NS2 y con flechas los cortes llevados a cabo por la proteasa viral. Adaptada de [55].

En la Tabla 1 se muestra un resumen de las funciones más importantes desempeñadas por cada proteína viral.

PROTEÍNA	RESIDUOS	MASA MOLECULAR (KDa)	FUNCIONES MÁS DESTACADAS
CORE	191	21	Unión a RNA; formación de la nucleocápsida viral
E1	192	35	Proteína de la envoltura; se asocia con E2
E2	363	70	Proteína de la envoltura; unión a receptores celulares; se asocia con E1
p7	67	7	Canal iónico, viroporina
NS2	217	23	Componente de la proteasa NS2-3
NS3	631	70	Dominio amino terminal con actividad proteasa Dominio carboxilo terminal NTPasa y helicasa
NS4A	54	8	Cofactor de la proteasa NS3
NS4B	261	27	Induce alteraciones en la membrana
NS5A	447	56-58	Fosfoproteína
NS5B	591	68	RNA polimerasa dependiente de RNA

Tabla 1. Resumen de las funciones más importantes desempeñadas por las proteínas del HCV en el ciclo viral.

1.4.1. PROTEÍNAS ESTRUCTURALES

1.4.1.1. La proteína Core

La proteína C es una proteína dimérica [56] que forma la nucleocápsida del virus y presenta tres dominios funcionales: un dominio amino terminal básico (D1, residuos 1-120) que interaccionaría con el RNA viral durante la formación de la nucleocápsida mediante interacciones electrostáticas [57] y contiene la región de dimerización (residuos 82-106), un dominio central hidrofóbico (D2, residuos 121-179) formado por dos hélices anfipáticas que se une a la cara extracelular del RE, y un dominio carboxilo terminal (D3, residuos 180-191) que es el péptido señal para el procesamiento de E1, que no formará parte de la proteína madura (figura 6). Dicha secuencia señal dirige la cadena polipeptídica naciente a la membrana del RE e induce la traslocación de E1 al lumen del RE, a la vez que la proteína C queda en el lado citosólico [57, 58]. El corte por la peptidasa señal en el lado luminal del RE separa E1 de la forma inmadura de la proteína C (p23), que contiene 191 aminoácidos y que es considerada como la forma completa que se encuentra anclada en la bicapa lipídica del RE por el péptido señal del extremo carboxilo terminal [59]. Una vez liberada la proteína, un segundo corte proteolítico catalizado por la peptidasa péptido señal (SPP) elimina el anclaje carboxilo-terminal (D3) quedando la forma madura (p21) libre para desplazarse a otros orgánulos, como los LDs (del inglés “Lipid Droplets”), que son orgánulos dinámicos que almacenan lípidos como triglicéridos y ésteres de colesterol rodeados por una monocapa fosfolipídica, y que han sido postulados como los lugares donde tiene lugar el ensamblaje de la nucleocápsida [59, 60].

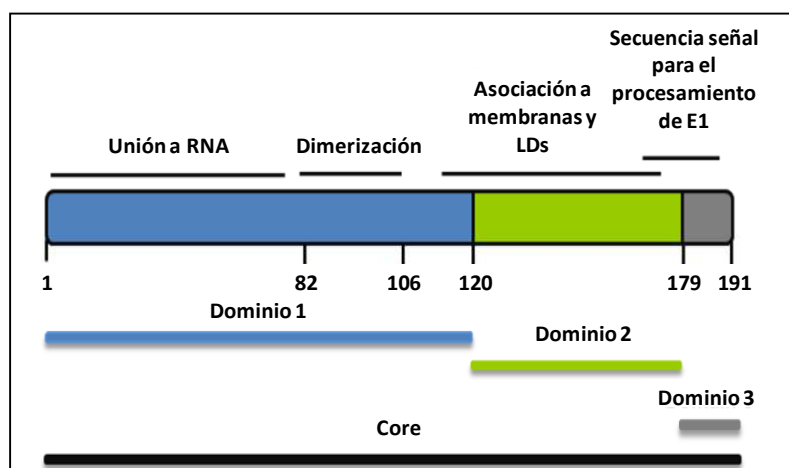


Figura 6. Representación esquemática de los dominios que forman la proteína Core con sus funciones asociadas. Adaptada de [61].

Además de su papel en el ensamblaje, la proteína C está implicada en la regulación del metabolismo lipídico de la célula hospedadora. La sobreexpresión de Core es suficiente para inducir la formación de LDs en células no hepáticas [62] y esteatosis (hígado graso) en ratones transgénicos [63].

Recientemente se ha señalado que la proteína Core interacciona directamente con diversas proteínas y vías de señalización celulares que podrían ser importantes para el ciclo del HCV, actuando a nivel de regulación de genes, apoptosis o respuesta inmunitaria [64].

1.4.1.2. La proteína F o ARFP

Se han encontrado formas alternativas de la proteína Core generadas por la iniciación interna de la traducción de un marco de lectura alternativo, o bien por desplazamientos ribosomales [65]. Además del marco de lectura abierto (ORF) que codifica la poliproteína, el genoma del HCV contiene un marco de lectura solapante +1 (ORF+1), en el mismo gen que codifica la proteína C. Se trata de una proteína quimérica que contiene los aminoácidos de los extremos N-terminal y C-terminal de Core y una nueva parte central codificada por dicho marco de lectura +1. La traducción a partir de este marco de lectura alternativo, probablemente a través de un mecanismo de desplazamiento ribosomal, da lugar a una proteína denominada F o ARFP (del inglés, “Alternative Reading Frame Proteins”) [66]. La detección por anticuerpos y la evidencia de inmunidad mediada por células [67] frente a esta proteína en el suero de pacientes infectados por el HCV, sugiere que ARFP se expresa durante la infección [68]. Su función en el ciclo del virus es desconocida, aunque no se puede excluir la posibilidad de que algunos de los efectos atribuidos a la proteína C sean debidos a la proteína F [68].

1.4.1.3. Las glicoproteínas de la envoltura E1 y E2

Las glicoproteínas E1 (gp31) y E2 (gp70) son los componentes principales de la envoltura del HCV y son necesarias para la entrada y la fusión viral [69, 70]. Son proteínas transmembrana tipo I, altamente glicosiladas, compuestas por un ectodominio amino terminal de gran tamaño y un dominio transmembrana carboxilo terminal, que ancla cada proteína a la membrana. Ambas proteínas se ensamblan como un heterodímero no covalente para llevar a cabo funciones de reconocimiento y fusión con la célula hospedadora [71]. En el próximo capítulo se abordará extensamente la biogénesis y el plegamiento de E1 y E2 así como la estructura de sus dominios transmembrana y sus ectodominios y las glicosilaciones presentes en éstos últimos.

1.4.2. PROTEÍNA P7

La proteína de membrana p7 consta de 63 aminoácidos y está compuesta por dos dominios transmembrana con sus extremos amino y carboxilo terminales orientados hacia el lumen del RE unidos por un pequeño lazo citoplásmico [72]. Se encuentra localizada entre las proteínas estructurales y las no estructurales en la poliproteína del HCV [73].

La proteína p7 no es requerida para la replicación del RNA viral y no está claro si es un componente del virión. Pertenece a la familia de las viroporinas [74, 75], y es capaz de formar complejos hexa y heptaméricos que sirven como canales iónicos permeables a potasio y sodio y parcialmente permeables a calcio y capaces de regular los niveles de acidez del virión y protegerlo durante el ensamblaje [76].

Esta proteína es importante en las últimas etapas del ensamblaje viral [77] y para la liberación del virus [75, 78, 79]. Además, se ha demostrado que es esencial para la infectividad del HCV [80] y que regula la formación de la cápsida viral [81]. Varios estudios han revelado la aparición de diferentes formas de la proteína bien asociada con E2 o bien con NS2, las cuales tendrían algún papel regulatorio en el proceso de producción viral [82, 83]. Así mismo, en muchos casos se ha podido observar que esta asociación es debida a la ausencia del corte proteolítico. Estas formas precursoras no tienen una labor claramente definida aunque parece que juegan un papel importante en el ciclo celular regulando los niveles de expresión de proteínas para evitar el ensamblaje prematuro [83, 84].

La ausencia de un anticuerpo monoclonal frente a p7 ha dificultado, hasta el momento, el estudio de dicha proteína de manera aislada y su implicación en el ciclo infectivo del HCV [76] aunque se ha descrito su importancia en morfogénesis y secreción de partículas infecciosas [85].

1.4.3. PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES (NS)

Las proteínas no estructurales del HCV son NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B.

NS2 es una proteína dimérica integral de membrana, compuesta por dos dominios topológicos y funcionales: un dominio altamente hidrofóbico amino terminal que ancla la proteína a la membrana, y un dominio cisteín-proteasa carboxilo terminal que realiza el corte proteolítico entre su propio carboxilo terminal y NS3 [26, 86]. NS2 no es necesaria para la replicación del genoma [87] pero juega un papel central en el

ensamblaje, interaccionando directamente con p7 y E2, independientemente de su actividad proteasa [80, 88-90].

NS3 es una proteína de 630 aminoácidos que presenta dos dominios con diferentes actividades enzimáticas esenciales para el ciclo viral del HCV. El segmento amino terminal presenta actividad serín-proteasa, mientras que los dos tercios restantes de la proteína presentan actividad NTPasa y RNA helicasa. La actividad proteasa es más eficaz en combinación con NS4A, que actúa como cofactor no covalente y promueve la asociación de NS3 a la membrana. Este complejo es el responsable de la liberación del resto de proteínas no estructurales presentes en el genoma viral. Además, la proteína NS3 está implicada en el bloqueo de la capacidad de la célula hospedadora de desencadenar una respuesta inmune antiviral innata [91]. Por otro lado, se ha propuesto que la helicasa NS3 está implicada en el ensamblaje viral [92]. La estructura cristalina de cada dominio aislado de NS3, así como de la proteína completa con o sin NS4A, ha sido determinada [93-95]. La proteasa NS3-NS4A es esencial para el ciclo viral ya que cataliza el procesamiento del resto de las proteínas no estructurales y por este motivo resulta ser una de las dianas virales más interesantes en la terapia contra el HCV.

NS4A es una proteína de menor tamaño que las anteriores, con tan sólo 54 aminoácidos, formada por tres dominios: un dominio central que actúa como cofactor de NS3, un dominio hidrofóbico amino terminal responsable de la localización de NS4A en la membrana y del reclutamiento de NS3 a la misma, y un dominio ácido carboxilo terminal que contiene aminoácidos importantes para establecer la replicación del RNA [11].

NS4B es la proteína peor caracterizada del HCV debido a su elevada hidrofobicidad. Se cree que es una proteína oligomérica de membrana compuesta por una región amino terminal que contiene dos hélices anfipáticas, un dominio central con cuatro segmentos transmembrana y un dominio carboxilo terminal con dos hélices [96]. Su principal función es alterar las membranas intracelulares y formar una red de membranas tipo “andamio” denominada *membranous web* que es esencial para la formación del complejo de replicación [97-99]. Además NS4B se puede unir directamente al RNA [100] y posee actividades ATPasa y GTPasa, para las que se requiere un sitio de unión a nucleótidos localizado entre las hélices transmembrana 2 y 3 del dominio central [101].

NS5A es una metaloproteasa dependiente de zinc muy fosforilada, cuya función en el ciclo viral no está claramente definida [102]. Se compone de cuatro dominios [103]: una hélice anfipática amino terminal esencial para la unión a las membranas celulares y que contribuye a la orientación hacia los LDs [104, 105]; un dominio D1 de

unión a RNA; un dominio D2 débilmente conservado e intrínsecamente desplegado que contribuye a la replicación del RNA [106]; y un dominio D3 carboxilo terminal crucial para el ensamblaje viral [107, 108] y la formación de partículas infecciosas [108-110]. NS5A es la diana de varias quinasas celulares, incluyendo las caseín-quinasas 1 y 2 (CK1 y CK2), lo que hace que en células infectadas sea detectada tanto en forma basal como en forma hiperfosforilada [111]. Se asume que el RNA viral recién sintetizado es transportado a los LDs por NS5A [60], cuyo estado de fosforilación regularía posiblemente el balance entre la replicación del RNA y el ensamblaje del virus [107, 108, 112-114].

NS5B es la RNA polimerasa dependiente de RNA. Se ha demostrado que es capaz de sintetizar RNA *de novo* de manera dependiente de cebador. Está compuesta por un dominio catalítico amino terminal y un dominio transmembrana carboxilo terminal que ancla la proteína a las membranas intracelulares [115, 116]. La estructura cristalina del dominio catalítico de NS5B revela un plegamiento semejante a otras polimerasas con estructura típica de mano derecha con los dominios dedo, palma y pulgar. La interacción entre los dominios dedo y pulgar sitúa el centro catalítico en la base de la palma, haciendo posible la síntesis de RNA de cadena positiva y negativa del HCV [117, 118]. Además presenta un sitio alostérico adicional para GTP [119]. Muy recientemente se ha definido el mecanismo mediante el cual incorpora los nucleótidos a la cadena de RNA naciente [120] siendo el Sofosbuvir un análogo de nucleótido que bloquea la polimerasa.

1.5. LAS GLICOPROTEÍNAS DE LA ENVOLTURA E1 Y E2

Las glicoproteínas de la envoltura E1 y E2 se encuentran en segunda y tercera posición en la poliproteína del HCV comprendiendo los residuos 192-383 y 384-746, respectivamente. De estos residuos, las regiones 353-383 y 712-746 son consideradas dominios transmembrana por su alto carácter hidrofóbico, mientras el resto de cada proteína es considerada como ectodominio por presentar unas propiedades de proteína soluble. El dominio transmembrana tiene la función principal de anclar las glicoproteínas a la superficie viral mientras que los ectodominios parecen ser los responsables del reconocimiento de receptores y la fusión con las células diana.

1.5.1. BIOGÉNESIS

Uno de los puntos críticos en el ciclo viral es el correcto procesamiento de las proteínas estructurales y no estructurales que tienen que ser liberadas de la poliproteína por las diferentes proteasas tanto virales como celulares, tal y como se describe en la figura 5. La síntesis de la poliproteína por parte del ribosoma se produce en las proximidades de la membrana del retículo de modo que la poliproteína va

atravesando el translocón de manera simultánea a su síntesis en dirección amino-carboxilo terminal. La presencia de la peptidasa señal en las proximidades de dicho translocón permite la liberación de cada una de las glicoproteínas para lo cual el dominio transmembrana tiene que formar una horquilla que aproxime el extremo carboxilo terminal a la cara luminal donde se produce el corte por la proteasa. Una vez procesadas E1 y E2, la orientación carboxilo terminal de los dominios transmembrana cambia de luminal a citosólica, gracias a la participación del propio translocón en este proceso, quedando el ectodominio en el lumen del retículo y el dominio transmembrana anclado a la misma como una única hélice con su extremo carboxilo terminal hacia el citosol [121]. En la figura 7 se muestra el modelo propuesto para explicar los cambios topológicos que experimentan los dominios transmembrana de E1 y E2 durante su biogénesis.

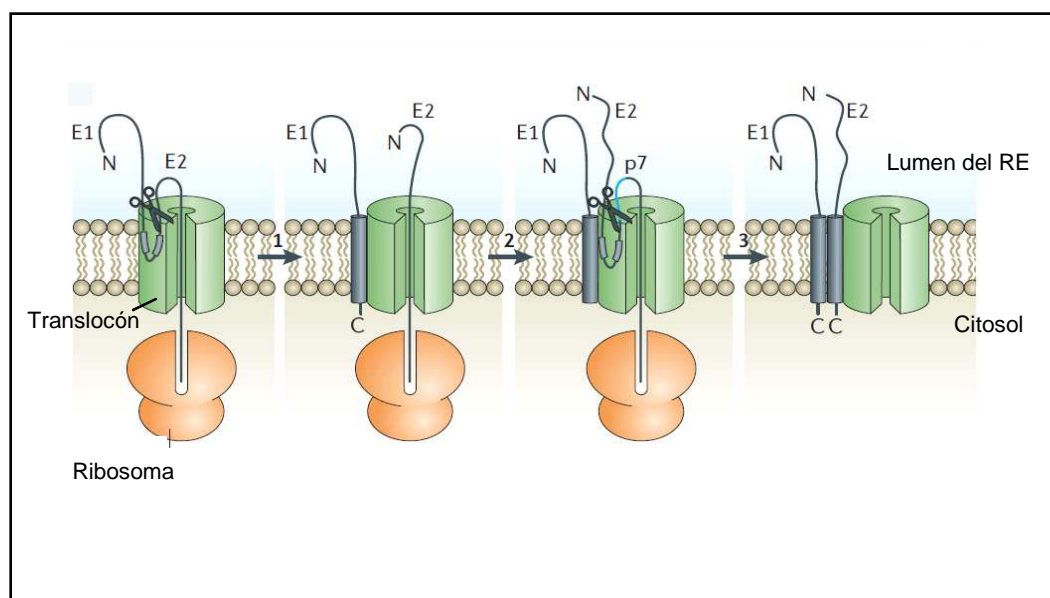


Figura 7. Topología adoptada por los dominios transmembrana de E1 y E2 durante su biogénesis. La poliproteína del HCV E1-E2-p7 está unida al ribosoma y al translocón. En primer lugar, el segmento carboxilo terminal hidrofóbico de E1 se inserta como una horquilla con un giro corto citoplásmico, sirviendo como péptido señal para E2. Después del corte por la peptidasa señal luminal (tijeras), el recién generado carboxilo-terminal de E1 atraviesa la membrana convirtiéndose la horquilla en una hélice continua. De la misma manera, el segmento hidrofóbico de E2 sirve como secuencia señal para p7 y vuelve a insertarse en la membrana una vez liberada ésta [121]. Adaptada de [122].

1.5.2. PLEGAMIENTO

Estudios realizados utilizando sistemas de expresión transitoria demuestran que E1 interacciona con E2 para dar lugar a oligómeros. En presencia de detergentes no iónicos, se detectan dos tipos de complejos E1-E2: por un lado, heterodímeros E1-E2 estabilizados por interacciones no covalentes y, por otro, agregados unidos por

puentes disulfuro que, según algunos autores, representan complejos mal plegados [71, 123].

Se ha demostrado que el plegamiento de E1 es dependiente de la coexpresión de E2 [124, 125], y que el plegamiento de E2, es a su vez, dependiente de la coexpresión de E1 [126, 127]. Estas observaciones indican que las glicoproteínas de la envoltura del HCV cooperan para la formación de un complejo funcional. Sin embargo, la proteína E2 presenta cierto grado de plegamiento cuando es expresada de manera aislada en su forma completa [125, 126]. Además, estudios en los que se ha descrito la producción del ectodominio aislado de E2 en células de insecto [128] o en células de mamífero [129], han permitido demostrar que E2 se comporta como una unidad de plegamiento independiente. Es más, la producción del ectodominio de E2 en el sistema de *baculovirus* en presencia y ausencia de E1 ha tenido como resultado la obtención de proteínas independientes, correctamente plegadas y con las mismas propiedades físico-químicas en ambos casos, lo cual revela que el ectodominio de E2 no requiere de la presencia de E1 para plegarse de manera funcional [130].

E1 y E2 parecen interactuar con la chaperona del RE calnexina [127, 131-133]. Ambas glicoproteínas se asociarían rápidamente con la calnexina y se disociarían lentamente, lo que sugiere que esta chaperona intervendría en el plegamiento de E1-E2. Sin embargo, otros datos posteriores sugieren que es sólo E1 la que interactúa con calnexina [127].

Inicialmente se pensaba que la unidad funcional básica de la envoltura viral estaba constituida por el heterodímero E1-E2 no covalente [123, 132, 134-136]. Pero un estudio posterior [137] reveló que los complejos covalentes son mayoritarios en los virus secretados y minoritarios en las células infectadas, lo que sugiere que estos grandes complejos son incorporados selectivamente en los viriones secretados para no quedar como agregados mal plegados en el RE. De hecho, se ha comprobado que son capaces de mantener una conformación nativa. La elevada masa molecular de los complejos formados por las glicoproteínas asociadas a los viriones sugiere que estas proteínas podrían formar una red organizada en la superficie del virión.

1.5.3. ECTODOMINIOS

La fuerte retención de las glicoproteínas del HCV en el RE hace muy difícil la obtención de células que expresen en su superficie dichas proteínas. Por ello, se han producido formas solubilizadas de éstas en las que se han eliminado los dominios transmembrana, expresándose tan solo los ectodominios. Éstos cumplen un papel fundamental en las primeras etapas del ciclo infectivo del HCV, ya que en ellos residen

tanto los sitios de unión a los receptores presentes en las células hepáticas como los péptidos fusogénicos implicados en la fusión de las membranas viral y celular.

El **ectodominio de E2** (residuos 384-661) está conectado al dominio transmembrana a través de un segmento hidrofóbico con repeticiones de 7 aminoácidos (residuos 675-699), región denominada STEM, que es esencial para la heterodimerización y para la infectividad [138].

Se han identificado cuatro regiones hipervariables (HVR del inglés “HyperVariable Region”) en E2 que difieren hasta un 80% entre los distintos genotipos de HCV. Los primeros 27 aminoácidos de E2 (residuos 384-410) constituyen la región HVR1 [139, 140] que es el único epítipo neutralizante identificado hasta el momento para el HCV. El hallazgo de un clon del HCV que carece de dicha región, con capacidad infectiva en chimpancés aunque fuertemente atenuada [141], puso de manifiesto la importancia de la región HVR1 en la entrada viral [142, 143] pudiendo mantener interacciones con el receptor SR-B1 [144]. Pese a la variabilidad de secuencia encontrada en HVR1, las propiedades físico-químicas de los residuos en cada posición y la conformación de HVR1 están altamente conservadas entre los distintos genotipos [144]. Esta región contiene un número elevado de residuos básicos que juegan un papel importante en la modulación de la entrada viral por su capacidad de interacción con moléculas cargadas negativamente en la superficie celular [143]. La segunda región hipervariable en E2 (HVR2) fue descrita por primera vez en virus del genotipo 1 [140, 145]. Al principio se describió como una secuencia de 9 aminoácidos por detrás de HVR1. Análisis posteriores, llevados a cabo sobre diferentes genotipos de HCV, sugieren un área de variación algo más extensa comprendiendo los residuos 461-481 flanqueados por cisteínas altamente conservadas y que forman un puente disulfuro dejando el lazo variable expuesto [146, 147]. Muestra un 100% de variabilidad de secuencia y parece estar implicada en la modulación de la unión de E2 a receptores celulares posiblemente a través de interacciones intramoleculares [148]. La siguiente región hipervariable descrita, igVR, comprende los residuos 570-580 y también aparece flanqueada por cisteínas. Está bastante conservada dentro de un mismo genotipo pero presenta una alta variabilidad intergenotípica [146]. La delección de cualquiera de estas dos últimas regiones en el contexto de E1 y E2 incorporadas a HCVpp (pseudopartículas de HCV) impide la heterodimerización de ambas glicoproteínas dando lugar a partículas no infecciosas [149]. La última región descrita fue HVR3 que comprende los residuos 434-450 y presenta una elevada actividad inmunológica [150].

El ectodominio de E2 puede ser expresado independientemente de la poliproteína y se pliega en una estructura capaz de unirse a los receptores celulares [151, 152]. Como se ha indicado anteriormente, se ha conseguido producir

eficazmente el ectodominio de E2 tanto en células de insecto mediante su infección con *baculovirus* recombinantes [128], como en células de mamífero [129], lo que ha permitido llevar a cabo su caracterización estructural. Así, el estudio del ectodominio de E2 recombinante mediante dicroísmo circular [128, 129, 153] y espectroscopía de infrarrojo [153], indican que la proteína está constituida principalmente por estructuras tipo β y no ordenada, lo que es consistente con la estructura secundaria esperada para una proteína de fusión tipo II. Con base en estos datos, Krey y *col.* [153] propusieron un modelo de organización terciaria del ectodominio de E2 (figura 8). La determinación de la conexión entre los 18 residuos de Cys presentes en el ectodominio de E2, en combinación con estudios de los sitios de unión con el receptor celular CD81 y con anticuerpos [148, 154, 155] ha permitido modelar el ectodominio de E2 en el plegamiento típico de las proteínas de fusión de tipo II, organizadas en tres dominios. 16 de las 18 Cys estarían formando puentes disulfuro, mientras que el enlace Cys 597-Cys 620 no ha sido asignado definitivamente.

Sin embargo, recientemente ha sido descrita de manera simultánea la estructura cristalográfica de la región central del ectodominio de E2 por dos grupos de investigación [147, 156]. Ambos grupos han recurrido a la misma estrategia de eliminar la región hipervariable HVR1 tanto como la región STEM. Cada uno ha abordado las glicosilaciones de una manera diferente, o bien mutando determinados residuos para evitar que se produzcan [147] o bien eliminándolas enzimáticamente tras la producción [156]. En ambos casos las proteínas son producidas en células HEK 293T asociadas a la región Fab de un anticuerpo y cristalizadas como complejos E2-Fab.

Los resultados obtenidos indican estructuras basadas en la formación de un sándwich de láminas β formado por 4 hebras internas y dos externas expuestas al disolvente. El lazo que conecta las hebras internas con las externas contiene 17 aminoácidos en forma bilobulada y presenta los sitios clave de unión al receptor (Tyr527, Trp529, Gly530 y Asp535). Este lazo quedará por delante o por detrás del sándwich, según el modelo. Se define, además, la presencia de hélices α rodeando la estructura de láminas β . Una representación de ambos modelos se muestra en la figura 9.

En ambos casos se demuestra que E2 sólo comparte similitudes estructurales y funcionales con el dominio III de las proteínas de fusión de clase II por lo que no podría ser considerada una de ellas. Además, el lazo fusogénico propuesto por Krey y *col.* [153] entre los residuos 502 y 520 queda ahora en el interior del sándwich por lo que, según este modelo, no podría actuar como tal.

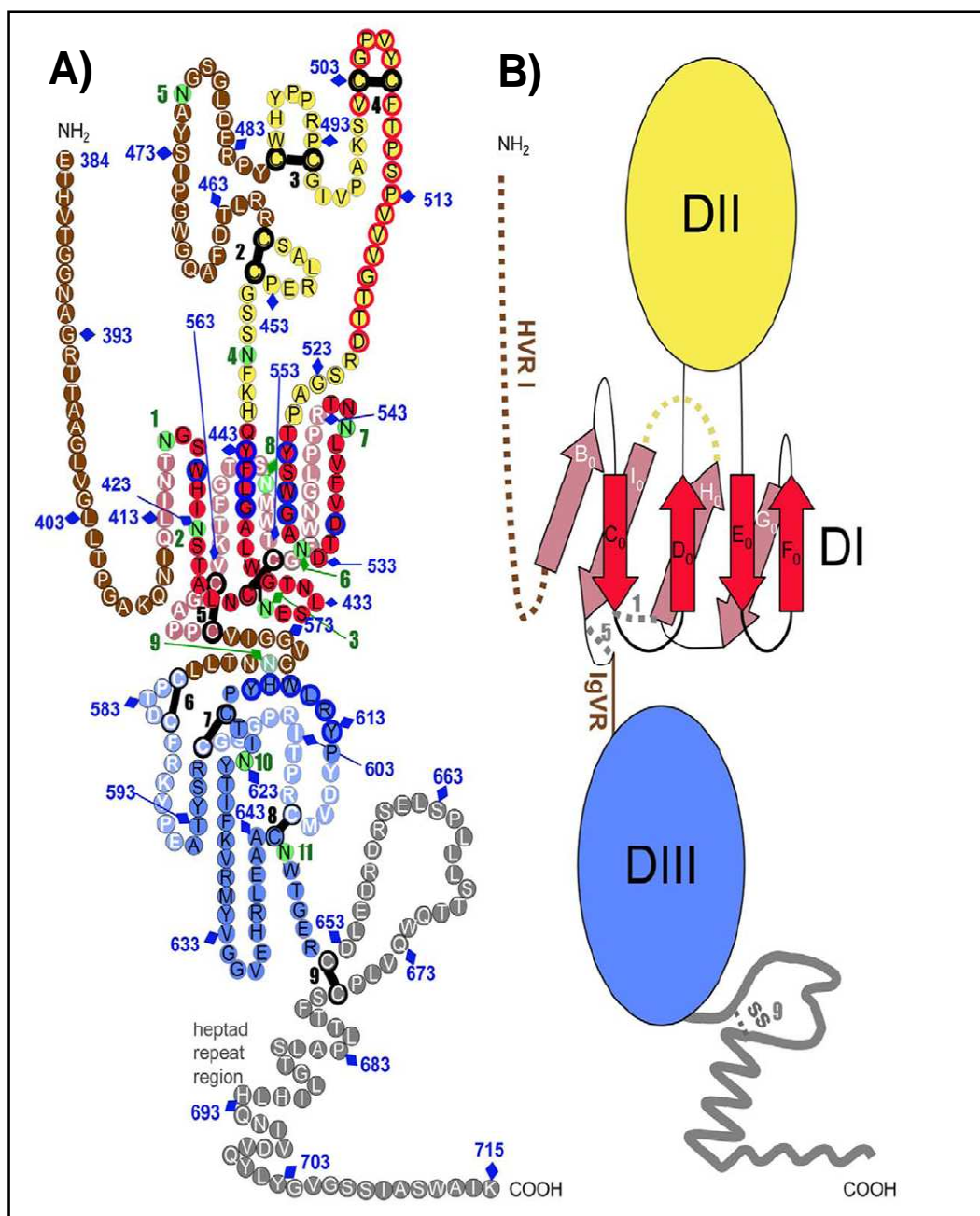


Figura 8. Organización terciaria del ectodominio de E2. (A) Secuencia de aminoácidos del ectodominio de E2 genotipo 1a línea H77 representada con un plegamiento típico de proteínas de fusión tipo II. Los círculos en color claro y oscuro representan, respectivamente, los residuos situados al fondo y al frente de los dominios. Los enlaces disulfuro y los sitios de glicosilación se indican como barras negras y círculos verdes, respectivamente, numerados secuencialmente. Los segmentos no estructurados aparecen con letra blanca sobre fondo marrón. Los residuos que participan en la unión con CD81 presentan un contorno azul, y los que forman parte del posible péptido fusogénico presentan un contorno rojo. (B) Diagrama esquemático de la organización terciaria del ectodominio de E2. Los dominios DI, DII y DIII aparecen en rojo, amarillo y azul, respectivamente. La región STEM aparece en gris. Se indica la conectividad entre las cadenas β en DI [153].

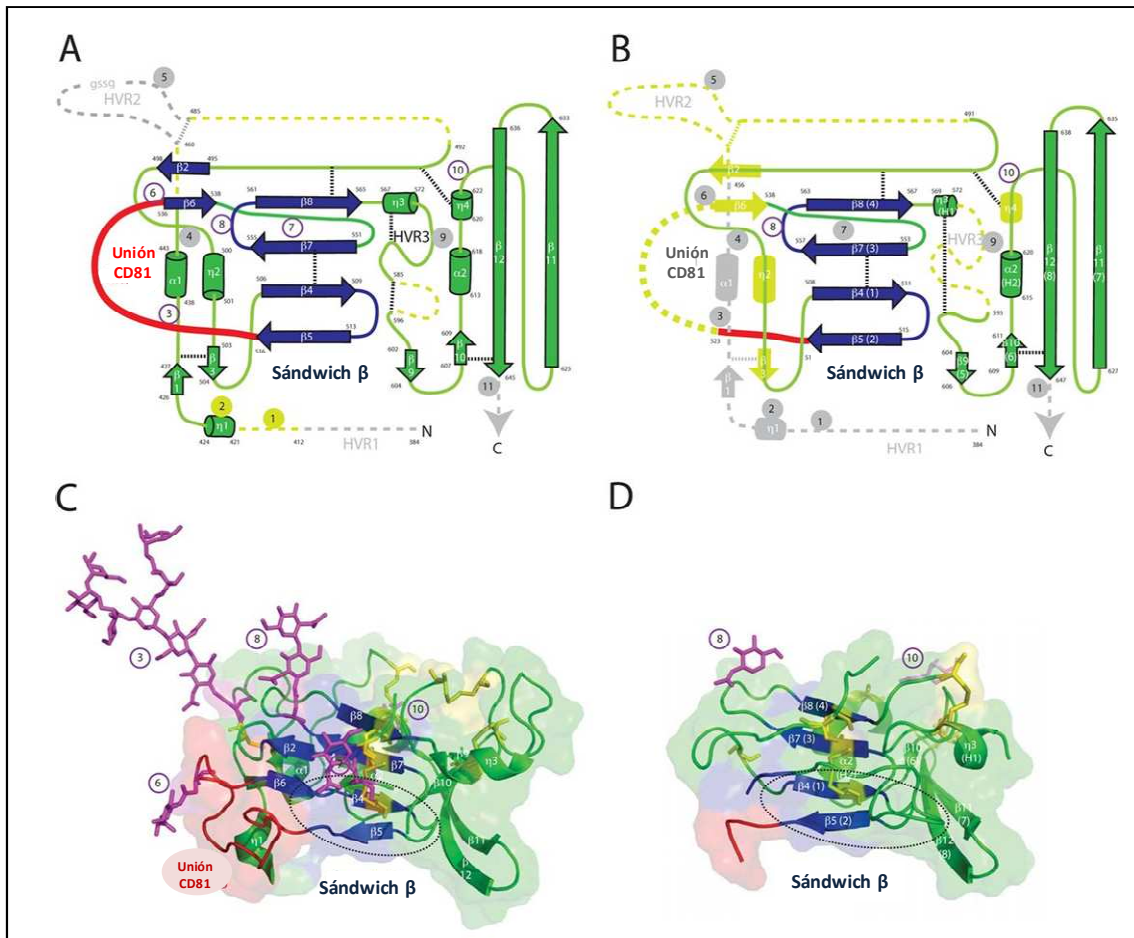


Figura 9. Estructura del núcleo del ectodominio de la glicoproteína E2. A) Diagrama de cintas propuesto por Kong y col. [147] para la estructura de E2. Las cadenas β son representadas por flechas y las hélices por cilindros. Los sitios de glicosilación están numerados desde el extremo N-terminal. Los puentes disulfuro están representados por finas líneas discontinuas en color negro. La longitud de los lazos puede no corresponder a la real. Las representaciones en gris corresponden a aminoácidos no presentes en la cristalización de la proteína. Las regiones en amarillo están presentes pero desordenadas. Los sitios de glicosilación 4 y 9 están mutados. La región HVR2 está eliminada y sustituida por la secuencia GSSG que está desordenada. B) Diagrama de cintas para la estructura propuesta por Khan y col.[156]. Los símbolos y colores son iguales que en el esquema A excepto para las glicosilaciones que fueron eliminadas enzimáticamente. C) Estructura cristalográfica de rayos X obtenida por Kong y col. Las cisteínas están representadas en amarillo. El círculo punteado indica el lazo de fusión propuesto por Krey y col. D) Estructura cristalográfica de rayos X obtenida por Khan y col. Los símbolos y colores son iguales que en el panel C. Adaptada de [157].

Estos hallazgos arrojan luz sobre la estructura de E2 como ectodominio aislado pero dificultan la interpretación de resultados que se había hecho hasta el momento considerando estas glicoproteínas como proteínas de fusión de clase II.

El **ectodominio de E1** (residuos 192-340) no ha podido ser expresado de manera independiente por lo que el patrón de puentes disulfuro formado por las 8 Cys presentes en su secuencia no ha sido determinado hasta el momento, aunque sí se ha descrito la importancia de las diferentes cisteínas en cuanto a infectividad, ensamblaje y heterodimerización [158].

Recientemente se ha descrito la estructura cristalográfica de un fragmento del dominio N-terminal del ectodominio de E1 constituido por los primeros 79 residuos de la glicoproteína [159]. Existe una horquilla β seguida de una hélice flanqueadas por tres hebras β antiparalelas, dos de las cuales se conectan por 10 residuos desordenados (figura 10). Estas estructuras forman dímeros mediante la interacción de las horquillas β en N-terminal formando un lámina β antiparalela. Dicha interacción es covalente ya que se estabiliza por puentes disulfuro.

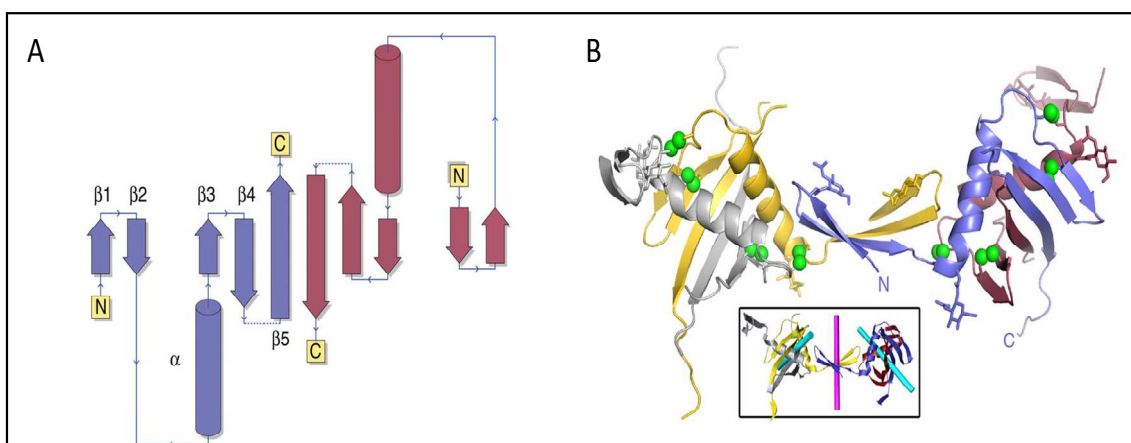


Figura 10. Plegamiento del dominio N-terminal de E1. A) Diagrama de cintas de un dímero covalente de E1 N-terminal. Cada monómero presenta un color. Las hélices se representan como cilindros y las cadenas como flechas. Las letras C y N encuadradas en amarillo indican las regiones amino y carboxilo terminal de cada monómero. B) Estructura tridimensional de un dímero de dímeros de la región N-terminal de E1. Cada monómero tiene un color diferente. Las cisteínas que forman los puentes disulfuro se muestran en verde y los azúcares como estructuras lineales. El cuadro representa los dos ejes correspondientes a las interacciones covalentes y no covalentes en cian y magenta respectivamente [159].

Los estudios bioinformáticos llevados a cabo hasta el momento habían sugerido que E1 tenía un plegamiento típico de proteínas de fusión de clase II truncadas. Sin embargo, los datos estructurales de este fragmento amino terminal no lo corroboran.

A excepción de la estructura de esta pequeña región N-terminal, hasta la fecha no existe ningún dato estructural adicional del ectodominio de E1 aislado y correctamente plegado. Para poder obtener información del ectodominio de E1 en

presencia de E2 se ha planteado el diseño de polipéptidos quiméricos conteniendo ambos ectodominios. Así, utilizando el sistema de *baculovirus*/células de insecto, en nuestro grupo de investigación hemos conseguido la expresión, secreción y purificación en condiciones nativas de la proteína recombinante E1₃₄₀E2₆₆₁, conteniendo los ectodominios de E1 y E2 unidos por una secuencia flexible FLAG de carácter hidrofílico [160]. La caracterización bioquímica, espectroscópica y antigénica de E1₃₄₀E2₆₆₁ indica que se comporta como una glicoproteína correctamente plegada. La permutación de los dominios para generar la poliproteína E2₆₆₁E1₃₄₀ no supone un cambio en ninguna de sus propiedades pero si se ven aumentados los niveles de expresión en células de insecto [161].

En cuanto al aspecto funcional, y según se ha mencionado anteriormente, E1 y E2 son las responsables de la unión y entrada del virus en la célula, siendo E2 la principal responsable de la unión a los receptores celulares. Además, estas glicoproteínas son las responsables de la fusión entre las membranas virales y celulares, existiendo gran controversia en cuanto a la identidad de la proteína fusogénica. Este tema se abordará extensamente más adelante.

1.5.4. LOS DOMINIOS TRANSMEMBRANA

Los dominios transmembrana (TMD) de las glicoproteínas de la envoltura viral E1 y E2 son esenciales para la unión a la membrana de dichas proteínas [162], la retención de las mismas en el retículo endoplásmico [163, 164] así como para la formación de heterodímeros funcionales E1E2 [165, 166].

Cada uno de estos dominios TMD consiste en dos hebras hidrofóbicas separadas por una serie de residuos polares altamente conservados [167] actuando la segunda de ellas como péptido señal para la liberación de la proteína situada a continuación en la poliproteína [121]. Así, el dominio transmembrana de E1, residuos 353-383 de la poliproteína, está compuesto por dos tramos de residuos hidrofóbicos conectados por un corto segmento hidrofílico, residuos 367-370, en el que hay un residuo de Lys370 totalmente conservado. Por su parte, el dominio transmembrana de E2, residuos 716-746, posee una organización a nivel de secuencia similar a la de E1, con dos residuos cargados altamente conservados, Asp728 y Arg730, en el segmento de conexión entre las dos regiones hidrofóbicas.

El segundo tramo de residuos hidrofóbicos de los TMD de ambas proteínas contiene la secuencia señal de corte por proteasas para la liberación de la siguiente proteína. Así, los residuos 370-383 de E1 actúan como secuencia de corte para E2 y los residuos 730-746 de E2 actúan como secuencia señal para el procesamiento de p7. Así mismo, son los 14 últimos residuos de C los encargados de actuar como señal para la

liberación de E1 [121]. Los cortes proteolíticos se producen entre los residuos 191/192, 383/384 y 746/747, respectivamente [168-170] (figura 11).

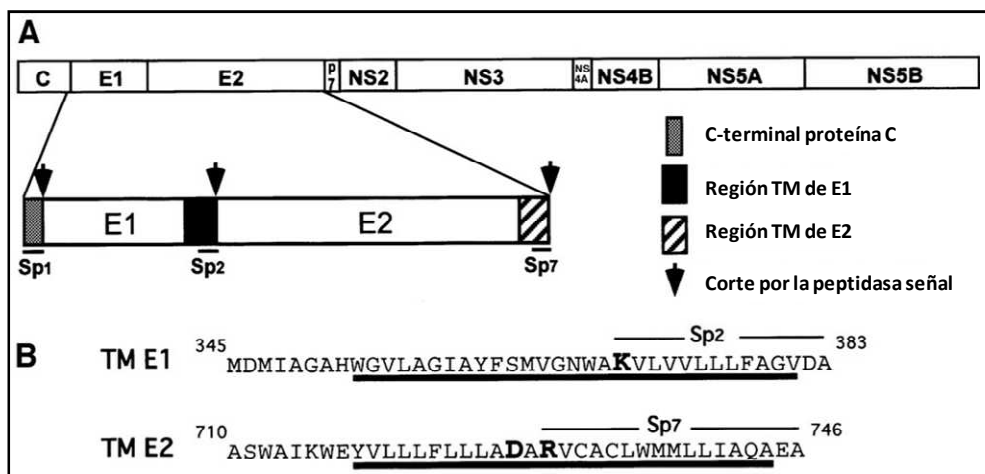


Figura 11. Representación esquemática de la estructura de los dominios transmembrana (TMD) de las glicoproteínas E1 y E2. A) Esquema de la poliproteína del HCV. Tras el procesamiento por la peptidasa señal (flechas), las glicoproteínas de la envoltura son liberadas. Sp1, Sp2 y Sp7 son las secuencias señal de E1, E2 y el pequeño polipéptido p7 respectivamente. B) Secuencias y organización de los TMD de E1 y E2. Los aminoácidos que corresponden al dominio transmembrana están subrayados, apareciendo en negrita los residuos polares altamente conservados en ambas proteínas. Las posiciones indicadas para los aminoácidos corresponden a su posición en la poliproteína para la cepa H77. Adaptada de [121].

En cuanto a la **arquitectura** de estos dominios en la membrana, se ha descrito la expresión, por separado, de los dominios transmembrana de E1 y E2 unidos a una proteína de unión a maltosa (MBP) y reconstitución en micelas con diversas composiciones lipídicas así como la caracterización por métodos de resonancia magnética nuclear (RMN) [171, 172]. Estos experimentos han revelado que el dominio transmembrana de E1 es capaz de adquirir, en micelas de SDS, una estructura plegada en la cual dos hélices α , conteniendo los residuos 354-363 y 371-379 estarían separadas por un segmento más flexible que comprende los residuos 364-370. En cambio, para micelas compuestas por LPPG, el fragmento flexible sólo comprendería los residuos 366-368 [172]. En cuanto al dominio transmembrana de E2, la estructura en micelas de LPPG comprende dos hélices formadas por los residuos 717-726 y 732-746 donde los residuos 727-731, que incluyen los dos aminoácidos cargados, quedarían en forma lineal flexible en una disposición cercana a la cabeza polar del fosfolípido para proporcionar un entorno menos hidrofóbico a sus cargas [171]. En ambos casos, la disposición observada en la membrana requiere la ruptura de la hélice en dos tramos, separados por un segmento flexible que permitiría la permanencia de toda la secuencia dentro de la membrana en una estructura no lineal (figura 12).

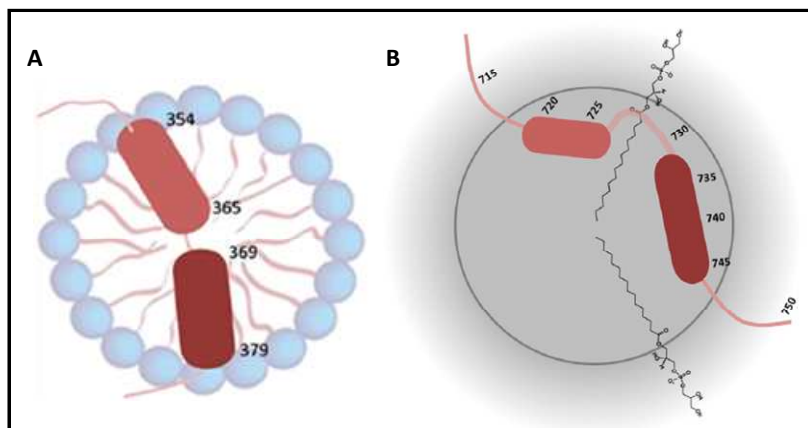


Figura 12. Representación de los resultados obtenidos para la reconstitución del dominio transmembrana de E1 (A) y E2 (B) en micelas de LPPG. Las hélices son representadas como cilindros mientras que las regiones flexibles o no estructuradas se representan por líneas cuyo grosor varía según el nivel de flexibilidad. Se muestran numerados los residuos que constituyen cada región del dominio transmembrana según esta predicción. Adaptadas de [172] (A) y [171] (B).

El estudio de la interacción que se produce entre estos dos dominios transmembrana ha resultado importante para tratar de dilucidar los mecanismos implicados en la formación de heterodímeros E1E2 [124, 125, 164, 165, 173]. Se han descrito dos aspectos claves en esta interacción: 1) La participación de residuos cargados de ambos dominios y 2) La presencia del motivo GXXXG en E1.

1) Los residuos cargados presentes en los dominios transmembrana fueron descritos como claves para la retención de las proteínas en el retículo ya que las proteínas mutadas en dichos residuos alcanzaban la membrana [167]. Sin embargo, la sustitución de estos residuos cargados por alaninas impide la heterodimerización de E1 y E2 [167]. A este respecto, se ha postulado la posibilidad de que se forme un puente salino entre ambas glicoproteínas [173]. De este modo, la Lys370 de E1 y el Asp728 de E2 formarían un puente salino que, por un lado, estabilizaría la interacción entre ambas proteínas y, por otro, neutralizaría las cargas en el interior de la membrana. Si esto fuera así, la Arg730 de E2 quedaría hacia el exterior de la interacción, de cara a los lípidos. Sin embargo, estudios de modelaje llevados a cabo por dinámica molecular (MD, del inglés “Molecular Dynamics”) proponen que la mutación de la Lys370 por alanina no resulta en una pérdida de heterodimerización, debido a que el Asp728 es capaz de establecer contactos estables con la Arg730 dirigiéndola hacia la interfaz hélice-hélice y permitiendo la interacción con la Asn367 de E1 siendo capaces de formar un puente de hidrogeno que estabilizaría la formación de dímeros. Sin embargo, si es el Asp728 el que es mutado por alanina, no se produce la rotación de la Arg730 anulándose la formación del heterodímero [174]. En la figura 13 se muestra una representación por MD de este proceso.

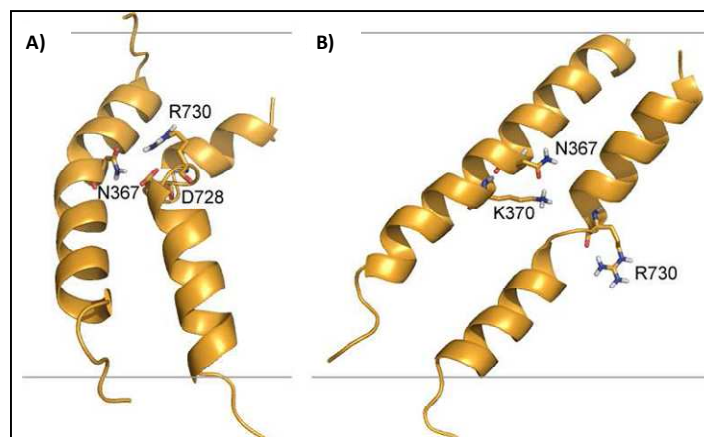


Figura 13. Captura final de la simulación por dinámica molecular para los mutantes A) K370A y B) D728A. Los residuos diferentes al mutado se muestran según su orientación relativa. La mutación de K370A produce una alteración en el plegamiento de E2 para permitir la orientación de R730 hacia la cara interna de la hélice. Adaptada de [174].

2) La presencia de un motivo GXXXG típico de las interacciones entre hélices α ha sido descrita también como un motivo de heterodimerización. Este motivo implicaría las glicocolas en posiciones 354 y 358 de E1. Estos residuos quedarían hacia el mismo lado de la hélice (figura 14) por lo que podrían estar implicados en la interacción entre E1 y E2 [174]. La sustitución de estos residuos por triptófano supone una disminución de la heterodimerización [173] que llega a ser total al eliminar la Gly en posición 358. La inserción de alaninas a lo largo de la secuencia también deriva en una disminución o incluso anulación de la heterodimerización cuando se altera el motivo GXXXG [165].

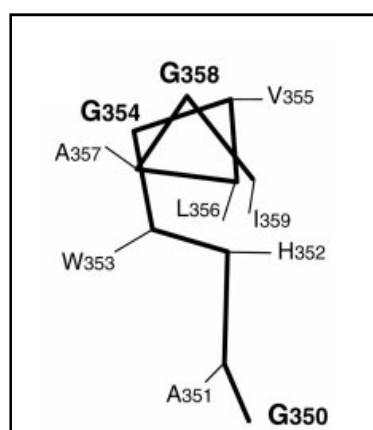


Figura 14. Representación esquemática de la disposición de los residuos en la hélice formada por el dominio transmembrana de E1. Esquema de líneas en el cual se recrea la disposición espacial de los diferentes residuos del dominio transmembrana de E1 en la hélice α . Se aprecia la presencia de los dos residuos de glicocola, implicados en la formación del motivo GXXXG de interacción, en la misma cara de la hélice. Adaptada de [165].

En definitiva, los estudios llevados a cabo sobre los residuos implicados en la interacción de los dominios transmembrana no permiten, hasta el momento, concluir cuáles de estos residuos realmente intervienen en la estabilización del heterodímero y cuál es la verdadera orientación de los dominios transmembrana en el interior de la bicapa, pudiendo ser esta orientación flexible adaptándose a la diferente polaridad del medio. Además, pese a haberse definido los residuos 353 de E1 y 712 de E2 como los iniciales de los dominios transmembrana, no existe ninguna evidencia experimental de cuál es la posición real que ocupan dichos segmentos con respecto a la bicapa lipídica.

1.5.5. GLICOSILACIÓN

Las glicoproteínas E1 y E2 presentan hasta 5 y 11 sitios potenciales de N-glicosilación, respectivamente (figura 15). La N-glicosilación ocurre por la transferencia de un oligosacárido de un intermedio lipídico a un residuo de Asn en una secuencia consenso Asn-X-Thr/Ser de una proteína naciente, donde X es cualquier aminoácido excepto Pro [175, 176]. Las N-glicosilaciones son catalizadas por la enzima oligosacariltransferasa, estrechamente asociada al translocón, que puede acceder a la cadena que emerge del ribosoma en el lado luminal del RE rugoso [177].

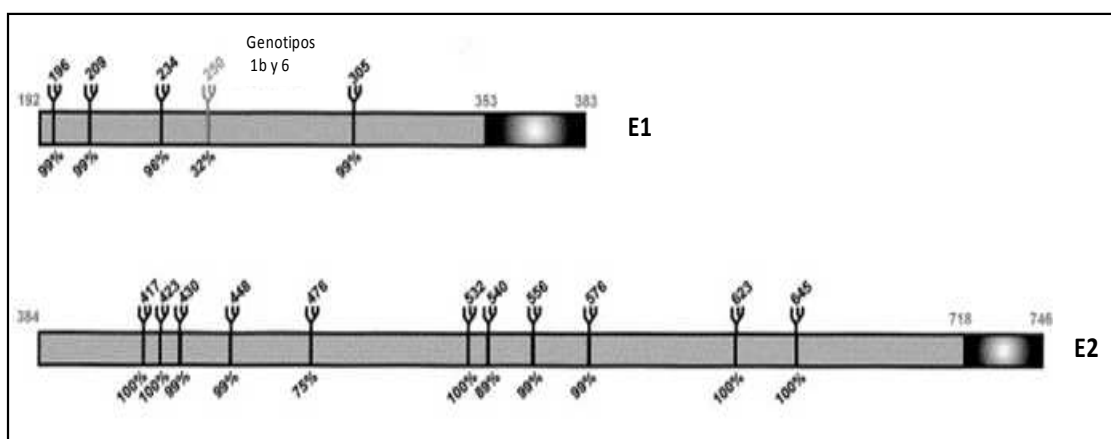


Figura 15. Representación esquemática de los sitios de glicosilación de E1 y E2 del genotipo 1 de la línea H77. Las posiciones de N-glicosilación se indican para cada proteína. La frecuencia con la que estos sitios aparecen glicosilados se muestra como porcentaje bajo cada sitio de glicosilación. La glicosilación en posición 250 de E1 aparece sólo en los genotipos 1b y 6. Adaptada de [178].

La naturaleza de las glicosilaciones presentes en E1 y E2 varía en función del sistema empleado para su estudio [179]. Los resultados obtenidos con el sistema del virus en cultivo celular (HCVcc), que es el sistema que mejor mimetiza la realidad, revelan que la proteína E2 presenta oligosacáridos de tipo complejo, lo que indica el tránsito de la proteína a través del aparato de Golgi, donde los oligosacáridos tipo manosa son modificados por las glicosidasas y glicosiltransferasas presentes en este

compartimento [180]. A pesar de ello, parte de la proteína E2 asociada a HCVcc presenta oligosacáridos tipo manosa que no han sido modificados por las enzimas presentes en el Golgi (figura 16).

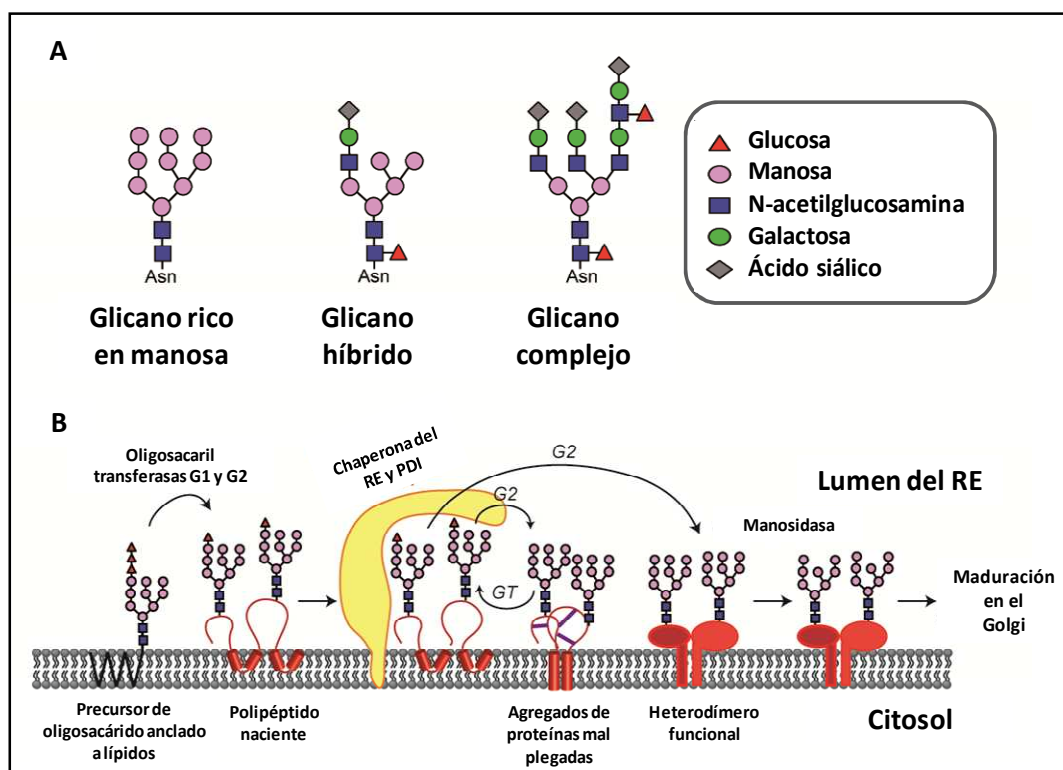


Figura 16. Representación esquemática del proceso de glicosilación de E1 y E2. A) Diferentes tipos de N-glicanos. Las glicosilaciones basadas en alto número de manosas son generadas en el lumen del retículo y pueden ser modificadas posteriormente en el aparato de Golgi para generar glicanos híbridos más complejos. B) El plegamiento de E1 y E2 es simultáneo con la formación de puentes disulfuro (líneas moradas) y la adición de glicosilaciones. El esquema muestra un proceso de glicosilación en el retículo donde el azúcar es transferido por la oligosacariltransferasa a la proteína naciente. Los intermediarios glicosilados son reconocidos y plegados por chaperonas del retículo asociadas a PDI (del inglés “Protein Disulfide Isomerases”) implicadas en la formación de puentes disulfuro. Si el plegamiento resulta erróneo se producirán desglicosilaciones mediadas por glucosidasas (G1 y G2) y reglicosilaciones mediadas por la glucosiltransferasa (GT) hasta que se consiga el plegamiento correcto. Cuando esto suceda, el complejo chaperona-PDI libera la glicoproteína que pasará por procesos de maduración de estos glicanos en el aparato de Golgi. Adaptada de [181].

Mediante análisis mutagénicos en los que se eliminan los sitios de N-glicosilación de las proteínas del HCV, se ha comprobado que varios de estos sitios son importantes para el plegamiento y la localización en la superficie de las proteínas, mientras que otros juegan un papel funcional importante o contribuyen a la evasión de la respuesta inmune del hospedador [178, 182].

La presencia de glicanos en una proteína puede influir en su plegamiento a través del sistema de chaperonas calnexina-calreticulina presente en el RE [180] (figura 16). La calnexina interacciona con las glicoproteínas del HCV pudiendo estar implicada en su plegamiento [133]. Otro estudio posterior realizado con HCVcc demostró que las glicosilaciones juegan un papel importante en distintas etapas del ciclo viral, así como en la sensibilidad frente a anticuerpos neutralizantes [183].

1.6. EL CICLO INFECTIVO DEL HCV

El HCV replica preferentemente en el citoplasma de los hepatocitos, aunque también se ha descrito la presencia de HCV en otros compartimentos o tipos celulares, como células mononucleares de sangre periférica [184, 185], células dendríticas [186] o sistema nervioso central [187].

Dada la dificultad derivada del trabajo con virus, para el estudio del ciclo celular y con objeto de obtener datos de cada una de las etapas del ciclo infectivo, muchos han sido los investigadores que han tratado de infectar células en cultivo con virus aislados del suero de pacientes infectados utilizando gran diversidad de líneas celulares.

El primer estudio, llevado a cabo por Shimizu *y col.* consistió en la incubación de células MOLT-4 (línea celular humana derivada de células T) con un suero que contenía HCV [188]. Siete días después, se detectó la presencia de RNA de cadena negativa en las células y la expresión de antígenos virales de la cápsida y NS4 por inmunofluorescencia, demostrando la susceptibilidad de las células a la replicación por HCV. Posteriormente se utilizó un clon de la línea celular HPB-Ma (otra línea derivada de células T), capaz de mantener la replicación del HCV de manera consistente [189].

Si bien diversos estudios han demostrado la susceptibilidad de líneas celulares derivadas de células T y B a la infección por HCV [190-195], no fue hasta 1997 cuando se demostró el tropismo hepático del HCV al observar la infección preferente de células PH5CH (línea celular humana derivada de hepatocitos) frente a células de una línea derivada de células T [196].

Dada la baja eficacia del HCV para establecer una infección persistente *ex vivo* y a la baja disponibilidad del HCV procedente del suero de pacientes, el estudio del ciclo viral y el de los componentes moleculares de las partículas virales ha sido posible gracias a la aparición de **sistemas *in vitro***, tales como la expresión de las glicoproteínas de la envoltura del HCV de forma recombinante, la producción de partículas tipo HCV o VLPs (del inglés “Virus Like Particles”) [197], el sistema del replicón [87, 198], la obtención de partículas trans-complementadas HCV_{TCP} [199], la producción de

pseudopartículas del HCV o HCVpp [69, 200] y el sistema para la producción de virus en cultivo o HCVcc [11-13]. Un esquema de cada proceso se muestra en la figura 17.

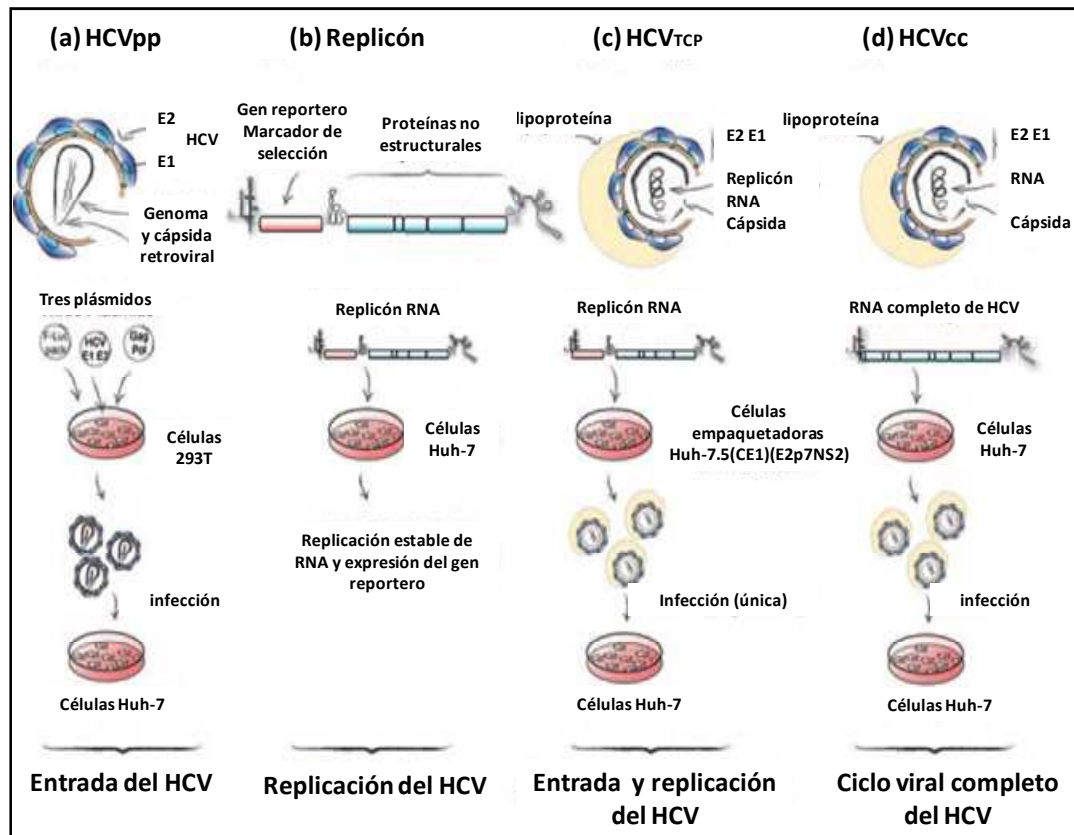


Figura 17. Representación esquemática de los diferentes sistemas de cultivo empleados para el estudio de las diferentes etapas del ciclo infeccioso del HCV. a) Las partículas HCVpp son producidas por transfección de células HEK 293T con tres plásmidos que contienen los genes retrovirales gag y pol, un vector retroviral que contiene un gen reportero y un tercer vector con los genes de las glicoproteínas E1 y E2. Las partículas retrovirales producidas contienen dicho gen reportero y presentan las glicoproteínas virales en su envoltura de modo que pueden entrar en las células diana del mismo modo que el virus original, careciendo de ciclo infeccioso. b) Los replicones subgenómicos son RNAs autoreplicativos basados en un gen reportero que reemplaza la región codificante desde la proteína Core hasta NS2, permitiendo la traducción de las proteínas no estructurales desde NS3 a NS5B. Tras la transfección, el RNA viral es directamente traducido y la replicación puede ser controlada por la expresión del gen reportero. c) Las partículas HCV_{TPC} son auténticas partículas virales que contienen un RNA replicón en lugar del genoma completo. Son producidas por transfección del replicón en células empaquetadoras que, de manera estable, expresan las proteínas estructurales que faltan en *trans*. La infección de células *naive* con estas HCV_{TPC} da lugar a una única ronda de infección en la que sólo tiene lugar la entrada viral y la replicación de RNA ya que las proteínas necesarias para la producción viral no están presentes. d) La producción de HCVcc está basada en el genotipo 2a JFH1. El genoma completo del virus es transfectado en células Huh7 produciéndose la traducción del RNA y la replicación del mismo, dando lugar a la producción de partículas virales que son capaces de infectar nuevas células diana, completando de este modo el ciclo viral completo del HCV. Adaptada de [201].

El empleo de las **glicoproteínas recombinantes** del HCV ha permitido la identificación de posibles receptores celulares, pero su uso se limita al estudio de su estructura y en ensayos de unión y endocitosis.

Las **VLPs** se generan mediante el autoensamblaje de las proteínas estructurales del virus, expresadas en células de insecto, en forma de partículas que no contienen genoma y no pueden replicar. Constituyen un modelo útil para ensayos de unión con la célula hospedadora.

Las **HCVpp** fueron desarrolladas de manera paralela por dos grupos de investigación en 2003 [69, 200]. Ambos grupos aprovecharon la capacidad de los retrovirus para incorporar glicoproteínas heterólogas en su envoltura, en este caso las proteínas de la envoltura del HCV, E1 y E2. Las glicoproteínas de la envoltura sin modificar se ensamblan en partículas formadas por la proteína Core de retrovirus o lentivirus. La presencia de GFP (del inglés “Green Fluorescence Protein”), o el gen marcador de la luciferasa empaquetado en las pseudopartículas como genes reporteros, permite la determinación rápida y fiable de la entrada viral mediada por las glicoproteínas del HCV. Este sistema sirve únicamente para el estudio de la entrada del virus en la célula diana y la identificación de los receptores clave en la entrada viral demostrando la complejidad del proceso y el alto nivel de regulación que conlleva [202].

Los **replicones** surgieron para el estudio de la replicación viral. Los primeros replicones generados [87] estaban constituidos por una cadena de RNA de doble hebra en la que los genes correspondientes a las proteínas estructurales se sustituyeron por un gen de resistencia a neomicina, de modo que no eran capaces de producir partículas virales, y en la que se incluían las regiones no codificantes 5' y 3', necesarias para la replicación viral. Esta construcción recibe el nombre de replicón subgenómico. La identificación de mutaciones de adaptación al cultivo celular, que confieren una mayor capacidad de replicación al RNA viral, hizo posible la generación de replicones genómicos que contienen el genoma de la poliproteína completa [203]. Estos replicones necesitaban mutaciones adaptativas al cultivo celular para replicar de forma eficiente y en niveles suficientemente altos para la selección por el gen marcador. Estas mutaciones adaptativas parecían interferir con la producción de partículas [204].

En el caso de las **HCV_{TCF}** se usan replicones subgenómicos que pueden ser empaquetados cuando las proteínas estructurales son aportadas en *trans*. Estas partículas trans-complementadas son infecciosas pero sólo realizan un único ciclo de infección y son incapaces de replicarse. Permiten el estudio del ensamblaje del HCV, en particular la encapsidación del genoma viral y la entrada a las células con unas medidas de bioseguridad no muy restrictivas [205].

El inconveniente de los sistemas anteriores es que no producen virus infectivos y sólo permiten el estudio de un único ciclo de infección. Este problema fue resuelto con el descubrimiento de un replicón subgenómico basado en una secuencia de genotipo 2a, que, por razones desconocidas, replicaba en niveles entre 50 y 500 veces mayores en comparación con los replicones utilizados hasta ese momento basados en el genotipo 1b [206]. Esta cepa JFH1 procedente del suero de un paciente japonés con hepatitis fulminante, es capaz de producir partículas virales infectivas, **HCVcc**, que permiten el estudio del ciclo viral completo [9, 12, 13]. Virus quiméricos que contienen los extremos 3' y 5' y la región NS2-NS5B de JFH1 (esencial para que se produzca la replicación y producción de partículas virales) y la región Core-NS2 procedente de otras cepas e incluso de otros genotipos, han sido especialmente relevantes para el desarrollo de nuevas estrategias antivirales, la prueba de vacunas y la caracterización de la respuesta inmunitaria humoral.

En líneas generales, el mecanismo exacto mediante el cual el virus alcanza el citoplasma de los hepatocitos e inicia la replicación no se conoce con exactitud. Sin embargo, las evidencias acumuladas hasta el momento utilizando los sistemas *in vitro* mencionados anteriormente indican que para llegar desde el endotelio sinusoidal hasta el espacio de Disse (espacio perisinusoidal), el virus asociado a lipoproteínas puede difundir a través de fenestras o poros en las células del endotelio hepático de unos 100-200 nm de diámetro [207], o bien ser capturado y llevado a los hepatocitos adyacentes por las lectinas de tipo C, DC-SING (del inglés “Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing non-integrin”) y L-SING (del inglés “Liver/Lymph node cell-Specific ICAM-3 Grabbing non-integrin”), expresadas mayoritariamente en las células dendríticas y en el endotelio sinusoidal, respectivamente [208, 209].

La interacción inicial del virión con la membrana celular sería mediada por glucosaminoglicanos (GAG) como el heparán sulfato, que ayudarían a concentrar el virus en la superficie celular [210-212]. Como consecuencia de la asociación entre el HCV y las lipoproteínas circulantes de la sangre [213, 214], también se ha propuesto que el receptor de LDL (LDLr) pueda participar en la entrada del virus en los hepatocitos [25]. A continuación, el HCV interacciona de manera específica y secuencial con SR-B1 (del inglés “Scavenger Receptor B1”) [152], la tetraspanina CD81 [151] y las proteínas de uniones estrechas claudina-1 [215] y ocludina [216]. También se han identificado dos receptores tirosina quinasa, EGFR (del inglés “Epidermal Growth Factor Receptor”) y EphA2 (del inglés “Ephrin type-A receptor 2”) como cofactores de la entrada del HCV. Estos receptores regulan la asociación entre CD81 y claudina-1 y la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática [217].

Asimismo se ha descrito la importancia del receptor NPC1L1 (del inglés “Niemann-Pick C1-Like 1”), implicado en la absorción intestinal de colesterol, en el

proceso de fusión de las membranas viral y celular [218]. Estas interacciones son mediadas por las glicoproteínas de la envoltura E1 y E2 asociadas de modo heterodimérico [219, 220]. Un resumen de los receptores descritos hasta el momento se muestra en la tabla 2.

FACTOR DE ENTRADA	FUNCIÓN NATURAL	ASOCIACIÓN CON HCV
Heparán sulfato (GAGs)	Polisacárido complejo implicado en numerosos procesos celulares	Reconoce ApoE en las lipoviroproteínas y facilita el anclaje celular
SR-B1	Proteína transmembrana de superficie que reconoce HDL, VDL y VLDL y facilita la transferencia de colesterol	Reconoce ApoE y E2. Facilita la entrada y requiere la transferencia de lípidos
CD81	Proteína transmembrana de superficie (tetraspanina) implicada en señalización y proliferación celular	Media la entrada y es sensible a la concentración de colesterol
Receptor de LDL	Reconoce LDL y media la recirculación de apolipoproteínas	Puede conducir a internación no productiva
NPC1L1	Receptor de membrana canalicular: reabsorbe colesterol de la bilis	Requerido para la infección de los hepatocitos por HCV
CLDN1	Proteína de uniones estrechas	Etapas tardías de entrada. Asociación con CD81
OCLN	Proteína de uniones estrechas	Etapas tardías de entrada
EGFR	Receptor de tirosina quinasas	Puede modular la interacción entre CLDN1 y CD81

Tabla 2. Resumen de las moléculas descritas para la entrada del HCV. Se muestra su función nativa y el papel que desempeñan en presencia del virus. Adaptada de [221].

Tras la unión a los receptores, el complejo es endocitado de modo dependiente de clatrina [222]. La fusión entre las membranas viral y celular se produce en los endosomas tempranos y es desencadenada por la acidificación de los mismos. El bajo pH de los endosomas induce cambios conformacionales en las glicoproteínas E1 y E2 dando lugar a la exposición de los péptidos de fusión y provocando la fusión entre la membrana viral y celular [200, 223]. En este proceso de fusión el genoma viral es liberado de la nucleocápsida y traducido en el RE. La proteína NS4B induce la formación de redes membranosas que servirían como andamio para el complejo de replicación viral [97, 98, 108]. Esta red de membranas se localiza muy próxima a la membrana del retículo endoplásmico, sugiriendo que pueda derivar de este mismo compartimento.

Tras la amplificación del genoma y la expresión de las proteínas virales, los viriones son ensamblados y liberados a través de una vía de secreción constitutiva de la célula diana. Aunque estos procesos son bastante desconocidos, se ha propuesto que existe una asociación entre el metabolismo de los lípidos y los procesos de ensamblaje y liberación del virus [213, 224]. Recientemente se ha demostrado que la

proteína Core se localiza principalmente en la membrana que rodea las gotas lipídicas LD y que esta asociación es importante para la formación de partículas infecciosas *in vitro*. Así, la proteína Core reclutaría a las proteínas no estructurales y los complejos de replicación en las cercanías de las gotas lipídicas donde se ensamblarían los viriones [60, 225].

Además, la vía de síntesis de VLDL está implicada en la secreción del HCV. El uso de inhibidores o de RNA de interferencia contra componentes de la vía de VLDL, como ApoB o ApoE, reprimen la secreción de partículas infecciosas [226-228]. En la figura 18 se muestra un modelo del ciclo infectivo del HCV propuesto por Koutsoudakis *et al.* [1]. En los capítulos posteriores se abordará con detalle cada una de las etapas del ciclo infectivo.

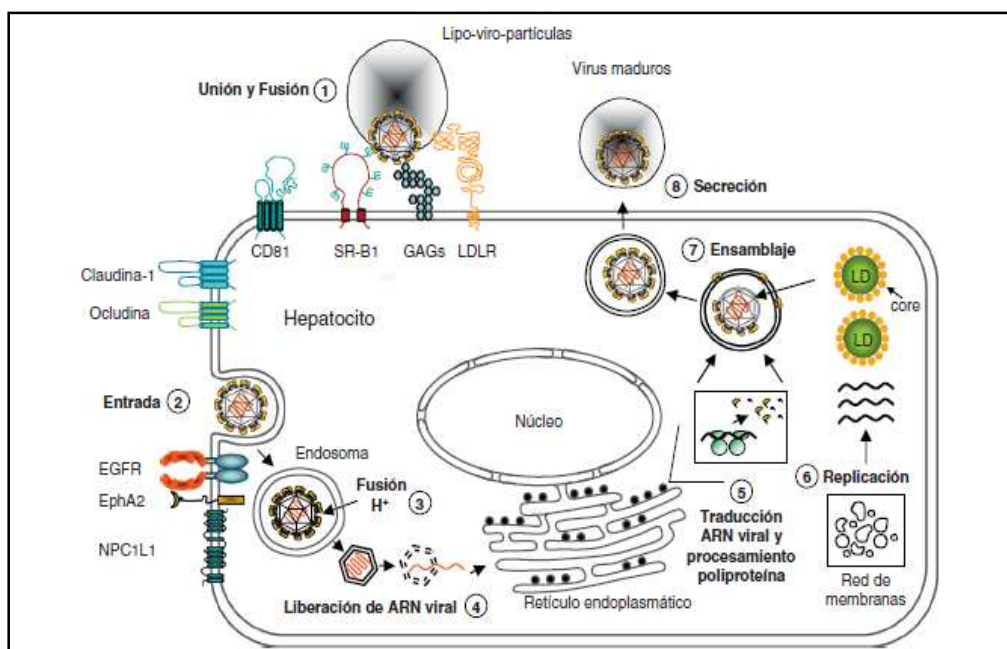


Figura 18. Representación gráfica del ciclo infectivo del HCV. La partícula viral circula libre o asociada a lipoproteínas (lipoviropartículas). 1) Interacción inicial del virión con la membrana celular mediada por glucosaminoglicanos (GAG). A continuación, el HCV interacciona de manera secuencial con los receptores LDLR, SR-B1, CD81, claudina-1 y occludina. Los receptores EGFR y EphA2 (y probablemente NPCL1L1) regularían la asociación entre CD81 y claudina-1 y la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática. 2) Entrada en el hepatocito producida por endocitosis dependiente de clatrina. 3) Fusión de la envoltura del virus con la membrana del endosoma mediado por la acidificación del segundo. 4) Desencapsidación y liberación del RNA viral. 5) Traducción del RNA viral y procesamiento de la poliproteína por proteasas virales y de la célula hospedadora. 6) Replicación del RNA viral en el complejo de replicación, asociado a la red de membranas. 7) Formación de la cápsida y ensamblaje de los nuevos viriones alrededor de LDs. 8) Las partículas del HCV se asocian a lipoproteínas y son liberadas a través de la vía de secreción celular. Adaptada de [1].

1.6.1. UNIÓN Y ENTRADA DEL HCV EN LAS CÉLULAS DIANA

1.6.1.1. Receptores del HCV

Glucosaminoglicanos (GAGs)

Los GAGs son polisacáridos lineales expresados en la superficie celular que actúan como sitios de unión para muchos virus. Podrían servir como receptores primarios, de baja afinidad, aunque abundantes, implicados en la interacción inicial del virus con la superficie celular antes de su unión a receptores de alta afinidad [229, 230]. De hecho, otros flavivirus como el virus del dengue tipo 2 y el virus de la fiebre amarilla, usan GAGs como receptores celulares [230, 231]. Se ha observado que la conservación de residuos cargados positivamente en el extremo amino terminal de E2 estaría relacionada con la interacción con el heparán sulfato (HS), un GAG altamente sulfatado [232]. Sin embargo, el papel exacto de los GAGs en la entrada celular no está claro. La proteína E2 soluble se une a la heparina, un análogo de HS, con alta afinidad, aunque estudios realizados con HCVpp no confirman este hallazgo [143]. Estas observaciones sugieren que el sitio de unión a HS no estaría accesible en los complejos formados por E1E2 en la superficie de las HCVpp o que la unión a GAGs está mediada por las lipoproteínas asociadas a las partículas del HCV.

Lectinas: DC-SIGN y L-SIGN

Las lectinas DC-SIGN y L-SIGN son proteínas de membrana homotetraméricas tipo II que pertenecen a la familia de las lectinas tipo C. Contienen un dominio de reconocimiento de carbohidratos en su región extracelular carboxilo terminal. L-SIGN y DC-SIGN se unen a E2 soluble con alta afinidad a través de los oligosacáridos tipo manosa, además de interactuar con HCVpp [209, 233] y con virus procedentes del suero de pacientes infectados [234]. DC-SIGN se expresa en células de Kupffer, células dendríticas y linfocitos. L-SIGN se expresa en células endoteliales sinusoidales hepáticas. DC-SIGN y L-SIGN podrían funcionar como receptores capaces de capturar y transmitir el virus a células permisivas y, por tanto, jugar un papel en la iniciación de la infección y el tropismo tisular [208, 209, 234].

Receptor de LDL (LDLr)

El receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLr) transporta partículas de lipoproteínas que contienen colesterol desde el medio extracelular al interior de las células. El ligando más importante para este receptor es LDL (lipoproteína de baja densidad), que contiene una única copia de la apolipoproteína B-100 en su superficie como componente proteico primario, y es el responsable del transporte de la mayoría

del colesterol del plasma. Además, este receptor presenta alta afinidad por lipoproteínas que contienen múltiples copias de apolipoproteína E, como algunas formas de VLDL (lipoproteína de muy baja densidad) y ciertas lipoproteínas de densidad intermedia. El papel del LDLr en la entrada del HCV fue propuesto por primera vez en 1999 [25]. Estos autores demostraron que las partículas del HCV asociadas a lipoproteínas procedentes del suero de pacientes y otros virus de la familia *Flaviviridae* utilizan el LDLr para entrar en la célula. Se aislaron las partículas virales asociadas a lipoproteínas o lipovirio partículas (LVPs) del suero de pacientes y se demostró que infectaban células de hepatoma de manera dependiente de LDLr [235]. Aun así, la función del LDLr en la infección por el HCV sigue siendo controvertida, ya que no se ha demostrado el papel de este receptor en el modelo *in vitro* de HCVcc. Estudios más recientes han confirmado la importancia de este receptor en la infección de hepatocitos humanos primarios [236]. Además, existe una correlación entre la expresión de LDLr en la superficie de las células de pacientes con infección crónica y un alto título viral [237].

CD81

CD81 es una proteína de membrana no glicosilada, perteneciente a la familia de las tetraspaninas, que se expresa en la superficie de numerosos tipos celulares. Contiene cuatro dominios transmembrana, dos lazos extracelulares llamados SEL (lazo extracelular pequeño, del inglés “Small Extracellular Loop”) y LEL (lazo extracelular grande, del inglés “Large Extracellular Loop”), y dominios intracelulares amino y carboxilo terminales (figura 19). El SEL (28 aminoácidos) es necesario para la expresión óptima en la superficie del LEL [238]. El LEL (80 aminoácidos) se compone de 5 hélices α y contiene 4 residuos de Cys [239] que forman dos puentes disulfuro. Su secuencia es variable, excepto entre humanos y chimpancés, las únicas dos especies permisivas a la infección por el HCV [240, 241].

Una característica importante de las tetraspaninas es que forman una red extendida en la superficie celular, donde interaccionan consigo mismas, con otras tetraspaninas y/o con integrinas. Esta red recibe el nombre de microdominios enriquecidos en tetraspaninas o TEMs, y están implicados en señalización celular, migración, adhesión, fusión, reorganización del citoesqueleto y proliferación.

CD81 fue propuesto como receptor del HCV con base en la unión de E2 soluble con el LEL de CD81 [151]. La integridad de los dos puentes disulfuro es requerida para la interacción CD81-HCV [242], y el sitio de interacción parece implicar los residuos 163, 186, 188 y 196 de CD81 [243, 244]. Las regiones de E2 implicadas en la unión con CD81 son controvertidas. Se han identificado varias regiones no contiguas en E2 como importantes para esta unión. Éstas comprenden los residuos 436-443, 527-535 y 613-

618 [148, 154, 155, 245], lo cual indica que la unión es conformacional y dependiente del correcto plegamiento de E2. La realización de inserciones de 5 aminoácidos en distintas regiones de las glicoproteínas del HCV expresadas en la superficie de HCVpp, reveló que los residuos Trp 529, Gly 530 y Asp 535 son críticos para la unión con CD81 [246].

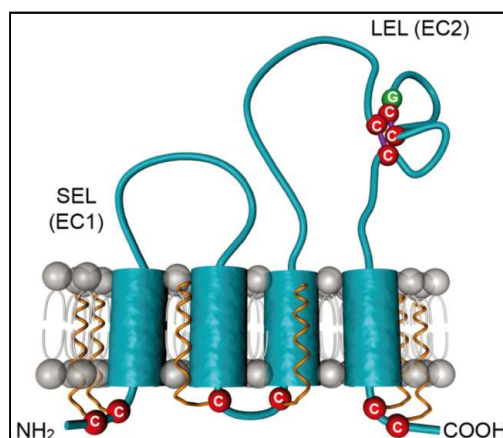


Figura 19. Representación esquemática de la topología del receptor CD81 del HCV. En el dominio LEL se representan en rojo los residuos de Cys conservados implicados en la formación de dos puentes disulfuro (morado) y en verde un residuo de Gly muy conservado. Las Cys susceptibles de palmitoilación se pueden observar en la cara interna de la membrana apareciendo dichas palmitoilaciones en marrón. Adaptada de [247].

Diversos estudios confirman la implicación de CD81 en la infección por el HCV. En líneas celulares de hepatoma humanas no permisivas a la infección por el HCV, como HepG2 y HH29, que no expresan CD81, tras la expresión ectópica del receptor se convierten en permisivas frente a la infección por HCVpp y HCVcc [242, 248-250]. Anticuerpos monoclonales dirigidos frente a CD81 y una forma soluble del LEL de CD81 inhiben la infectividad de HCVpp y HCVcc *in vitro* [12, 69, 200, 248, 251] y la infección del HCV *in vivo* [252]. El silenciamiento de la expresión de CD81 en hepatocitos primarios humanos y en células de hepatoma inhibe la infección por el HCV [250].

Varios estudios sugieren que CD81 actúa como una molécula de entrada tras la unión del virus. Anticuerpos específicos anti-CD81 y la forma recombinante del LEL de CD81 inhiben la infección por el HCV únicamente tras la unión del virus [248, 253, 254]. Es más, la susceptibilidad a la infección por el HCV no depende sólo del nivel de expresión de esta molécula [231, 253], sino también de las proporciones de CD81 y SR-B1 en la superficie celular [232]. EWI-2wint, una molécula que se asocia a CD81 expresado en la superficie celular, bloquea la entrada viral mediante la inhibición de la interacción de éste con el virus [255]. La ausencia de este inhibidor natural de CD81 en células hepáticas podría permitir la entrada viral y contribuir al hepatotropismo del HCV. La unión E2-CD81 juega un papel fundamental en la infectividad del HCV ya que

da lugar a la relocalización dependiente de actina de los complejos E2/CD81 a las zonas de contacto célula-célula donde CD81 entra en contacto con ocludina y claudina-1 [235]. Se puede decir, por tanto, que CD81 prepara a E1E2 para la exposición al pH ácido del endosoma que va a dar lugar a la fusión del virus con la célula [236].

SR-B1 (Receptor Scavenger clase B tipo 1)

SR-B1 es una glicoproteína de 57 kDa con dos dominios citosólicos amino y carboxilo terminales, separados por un dominio extracelular grande que presenta 9 sitios potenciales de N-glicosilación [237, 238, 240]. Es un receptor de superficie altamente expresado en el hígado y en tejidos esteroideogénicos. Juega un papel fundamental en el metabolismo del colesterol HDL (lipoproteínas de alta densidad) y regula el suministro de colesterol a los tejidos esteroideogénicos. SR-B1 media también la unión y transferencia de lípidos procedentes de diferentes clases de lipoproteínas [239] y facilita el metabolismo de LDL, VLDL y lipoproteínas oxidadas o acetiladas [241].

SR-B1 ha sido propuesto como receptor del HCV debido a su interacción con E2 soluble [152]. La región HVR1 de E2 es la responsable de la unión al lazo extracelular de SR-B1, ya que su delección impide la interacción con el receptor, y reduce la infectividad de HCVpp [69, 152]. Es más, el empleo de anticuerpos dirigidos frente a SR-B1 reduce significativamente la infectividad de HCVpp [242]. De modo similar a CD81, SR-B1 actúa como receptor tras la unión del virus. Así, anticuerpos dirigidos frente a estos dos receptores inhiben la infección cuando son añadidos tras 60 segundos de la unión del virus [248, 256]. El hecho de que HCVcc se una a células CHO que expresan SR-B1 en su superficie pero no células CHO que expresan CD81 [215] podría implicar que fuera necesario un primer contacto con SR-B1 antes de que la partícula viral pueda interaccionar con CD81.

Curiosamente, HDL, el principal ligando de SR-B1, facilita la entrada de HCVpp y HCVcc en la célula, aunque no hay evidencia de una interacción directa entre HDL y las partículas virales [155, 243, 244]. Se ha postulado que el efecto de HDL podría producirse a través de una interacción entre HDL y las membranas lipídicas o mediante la activación de SR-B1 por HDL. En cambio, otros ligandos naturales de SR-B1, como VLDL [245] y LDL oxidadas [257], tienen efectos inhibitorios en la entrada de HCV procedente de sueros y HCVpp, respectivamente. SR-B1 podría actuar como proveedor de colesterol, regulando la organización de CD81 en la membrana e impulsando la permisividad de las células a la infección por el HCV.

El establecimiento de ensayos de transcomplementación funcionales, en los que la entrada del HCV es restaurada gracias a la expresión ectópica de SR-B1, ha

permitido demostrar que SR-B1 y su actividad fisiológica de transferencia de lípidos son necesarios para la entrada del HCV [248, 249].

Proteínas de las uniones estrechas: Claudina-1 y Ocludina

Las moléculas claudina-1 y ocludina forman parte de las denominadas uniones estrechas, complejos de adhesión célula-célula que separan las membranas apicales y basolaterales, y mantienen la polaridad celular formando una membrana interna, lo que permite la difusión de ciertas moléculas y limita la de otras [251]. Las glicoproteínas del HCV promueven alteraciones en la localización y en la funcionalidad de las proteínas de las uniones estrechas [252], lo que proporciona nueva información acerca de los daños celulares producidos por la infección del HCV, como la colestasis, caracterizada por la disminución o interrupción del flujo de bilis, que está asociada a la alteración funcional de las uniones estrechas.

Claudina-1 (CLDN-1). En el año 2007, Evans y su equipo identificaron CLDN-1 como correceptor del HCV [215]. La CLDN-1 se expresa en tejidos epiteliales aunque predominantemente en el hígado, formando redes en las uniones estrechas [253]. Consta de 211 aminoácidos, con dos lazos extracelulares, 4 segmentos transmembrana y 3 dominios intracelulares [254]. El dominio altamente conservado en el primer lazo extracelular parece estar implicado en la entrada del HCV [215]. La expresión de CLDN-1 confiere susceptibilidad a la infección por HCVpp en líneas celulares no hepáticas como HEK 293T y SW13, mientras que su silenciamiento inhibe la infección del HCV en células susceptibles [215]. Estudios funcionales indican que este receptor participa en una etapa de la infección posterior a la unión, a continuación de la unión del HCV a CD81 y SR-B1 [215]. Mediante analogías con otros virus [258], se cree que la interacción con CLDN-1 tiene lugar tras la migración lateral del complejo HCV/SR-B1/CD81 a las uniones estrechas. La distribución de la CLDN-1 en las uniones estrechas se correlaciona con la permisividad a la infección por el HCV [259, 260], lo que confirma que la localización de CLDN-1 en las uniones estrechas es importante para la entrada viral y el hepatotropismo del HCV. Diversos estudios han demostrado que existe una asociación directa CLDN-1/CD81 [259, 261-263], sugiriendo un papel para dichos complejos en la entrada del virus.

En una reciente publicación se ha descrito que un péptido de 18 aminoácidos de CLDN-1 correspondiente a la región intracelular y la primera región transmembrana del receptor, es capaz de inhibir la infección por el HCV en una etapa post-unión [264]. Además, la sobreexpresión de este péptido da lugar a su interacción con las glicoproteínas del HCV.

Ocludina. En 2009 se describió que otro de los componentes de las uniones estrechas, la ocludina, juega un papel importante en la entrada del HCV y en una infección productiva por el virus [260]. La ocludina es una proteína de 60 kDa con 4 regiones transmembrana, dos lazos extracelulares y amplias regiones citosólicas amino y carboxilo terminales [265].

El silenciamiento de los genes que codifican CLDN-1 y ocludina da lugar a la inhibición de la entrada de HCVpp y HCVcc [260]. Los pasos iniciales de unión del HCV no se ven afectados por el silenciamiento del gen de la ocludina sugiriendo que ésta tiene un papel importante en etapas tardías del proceso de entrada [216]. Análisis de microscopía confocal muestran que la ocludina se acumula en el RE y que colocaliza con la proteína E2 del HCV [252]. Esta asociación E2-occludina ha sido confirmada por co-inmunoprecipitación [252, 260]. También se ha demostrado que la ocludina humana posibilita la infección del HCV en células de ratón [249]. En conjunto, estos datos sugieren que la ocludina interacciona directamente con E2, facilitando la entrada del virus a través de las uniones estrechas de los hepatocitos. Además, la delección del segundo lazo extracelular de ocludina anula la capacidad de las HCVpp para entrar en las células, así como su capacidad para inmunoprecipitar con E2 [266]. Sin embargo, esta región expresada de manera recombinante no es capaz de unirse a E2 soluble [266].

En un sentido opuesto a lo anteriormente descrito, varios estudios han demostrado que los receptores CLDN-1 y ocludina podrían suponer una barrera frente a la infección por el HCV cuando están formando parte de las uniones estrechas. Así, por ejemplo, en estudios con partículas de HCV fluorescentes, se observa que la internación ocurre fuera de las zonas de contacto célula-célula [267]. Es más, mutantes de CLDN-1 y ocludina que carecen de dominios importantes para su localización y correcta funcionalidad en las uniones estrechas, son capaces de hacer que las células sean susceptibles a la infección por el HCV [215, 261, 266].

Receptor de colesterol Niemann-Pick C1-tipo 1 (NPC1L1)

El receptor descrito más recientemente en la entrada del HCV ha sido el receptor de colesterol NPC1L1 [218]. NPC1L1 posee 13 dominios transmembrana y se expresa en la superficie apical de enterocitos intestinales y hepatocitos humanos, incluyendo las células Huh7, siendo responsable de la absorción de colesterol por las células y de la homeostasis de colesterol de todo el cuerpo [268, 269]. La dependencia de la infección del HCV con el colesterol llevó a Sainz y *col.* (2012) a pensar que otro receptor de colesterol, además de LDLr y SR-B1, como NPC1L1, jugase un papel en la entrada de este virus. Así, estos autores han demostrado no sólo que la expresión de NPC1L1 es necesaria para la infección por el HCV, sino que, además, el Ezetimibe, un

antagonista de NPC1L1 [270, 271], bloquea la infección por la mayoría de los genotipos del HCV *in vitro* e *in vivo*, retrasando el establecimiento de la infección del genotipo 1b del HCV en ratones con injertos de hígado humano.

1.6.1.2. Endocitosis

Tras la interacción con los receptores celulares, el virus es endocitado y se localiza en los endosomas tempranos, donde tiene lugar la fusión entre la membrana viral y celular. Distintos estudios señalan que la internación del HCV en los hepatocitos es dependiente de la endocitosis mediada por clatrina [222, 272, 273].

La información disponible acerca del papel del tráfico de receptores en la entrada del HCV es limitada. Diversos estudios sugieren la participación de distintos receptores o complejos de receptores en la internación del virus. Por ejemplo, Schwarz y *col.* [274] han demostrado que los contactos celulares modulan los niveles de expresión de SR-B1 y CLDN-1 y promueven la entrada del HCV. Mediante la sobreexpresión de estos receptores por separado se comprobó que SR-B1, pero no CLDN-1, era capaz de incrementar la velocidad de internación de HCVpp y HCVcc, lo que sugiere la participación de SR-B1 en este proceso. Liu y *col.* [266] demostraron que la ocludina forma complejos con dinamina II, una GTPasa importante para la endocitosis, a través del segundo lazo extracelular. Tanto la infección por HCVcc como por HCVpp son sensibles a la inhibición o silenciamiento de la dinamina, por lo que se ha sugerido que la ocludina podría actuar como puente entre el HCV y las maquinarias de endocitosis mediadas por dinamina. Un estudio posterior sugiere también la participación del complejo CD81/CLDN-1 en la entrada del HCV [275].

1.6.2. FUSIÓN

Tras la unión del HCV a los receptores celulares y la endocitosis dependiente de clatrina ya descritas, la nucleocápsida del virus es liberada en el citoplasma de la célula como resultado del proceso de fusión entre las membranas viral y celular.

La fusión ocurre en los endosomas tempranos y es dependiente del pH ácido de este compartimento [200, 222, 272, 273, 276]. Es precisamente la protonación de histidinas la que da lugar a la activación de la función fusogénica de una proteína alterándose, a pH ácido, los puentes de hidrógeno y favoreciendo la formación de puentes salinos con aminoácidos cargados negativamente como el aspártico o la arginina [277].

Las glicoproteínas de HCV son las responsables de la fusión, ya que en ensayos *in vitro* con HCVpp o HCVcc y liposomas, la fusión sólo tiene lugar en presencia de E1 y E2 [223, 278].

En virus, se han descrito dos tipos de proteínas de fusión (I y II) [279]. Las proteínas de fusión tipo I se caracterizan por formar proyecciones puntiagudas en la superficie del virión y por presentar una estructura mayoritariamente helicoidal. Su maduración requiere un corte proteolítico que libera su péptido de fusión amino terminal. En cambio, las proteínas de fusión tipo II se encuentran casi planas con respecto a la superficie del virión y presentan un alto contenido en estructura β . Este tipo de proteínas se ordenan en tres dominios (DI a DIII) y forman dímeros orientados cabeza-cola. Contienen un péptido fusogénico interno que se inserta en forma de lazo en la membrana. La proteína de fusión no sufre un corte proteolítico, pero sí su proteína acompañante.

En el caso de la familia de los flavivirus, la entrada se produce por endocitosis mediada por receptor y usan proteínas de fusión tipo II [14]. Basándose en potenciales homologías estructurales con estas proteínas, se ha propuesto que E2 sea una proteína de fusión tipo II [280], siendo E1 la proteína acompañante. El modelo del plegamiento de E2 propuesto por Krey y *col.* [153] de acuerdo con las características descritas para las proteínas de fusión tipo II (figura 8), ha permitido proponer el segmento 502-520 como candidato a péptido de fusión en E2. Sin embargo, la determinación de la estructura por Kong y *col.* [147] y Khan y *col.* [156] demuestra que esta región queda en el interior de la estructura plegada no pudiendo actuar como péptido fusogénico. Es por ello por lo que existe controversia en cuanto a la identidad de los péptidos de fusión y de la proteína que los porta.

Así, el análisis del perfil de hidrofobicidad interfacial de la proteína E2 revela la existencia de tres regiones con tendencia a interaccionar con membranas (residuos 430-449, 543-560 y 603-624). De hecho, los péptidos sintéticos correspondientes a estas regiones presentan propiedades desestabilizantes de bicapas lipídicas [281]. En relación a este aspecto, y basándose en el perfil de hidrofobicidad de E1, han sido también muchos los autores que han propuesto la región 273-290 como un posible péptido fusogénico por sus propiedades hidrofóbicas [282-284]. Asimismo, la caracterización biofísica de este péptido producido de manera aislada, determina la capacidad del mismo para desestabilizar membranas lo cual lo definiría como un péptido con actividad fusogénica [285].

Aunque la utilización de péptidos proporciona una idea del efecto que producen las distintas regiones de E1 y E2 en su interacción con membranas, no es siempre posible extrapolar dichos efectos al proceso de fusión *in vivo* debido a que

estos fragmentos no siempre mimetizan las propiedades de la proteína en la que se engloban, tales como la oligomerización o los cambios conformacionales producidos durante la fusión. Este hecho justifica el empleo de sistemas más complejos para el análisis de la capacidad fusogénica de las proteínas de la envoltura del HCV.

En este sentido, utilizando HCVpp y HCVcc e inhibidores de la acidificación del endosoma, así como bases débiles, se ha demostrado que la entrada en la célula es dependiente del pH [212, 242]. Además, estudios de mutagénesis dirigida utilizando también el sistema de HCVpp han identificado tres regiones importantes para la fusión con vesículas modelo [283], una localizada en E1 (residuos 270-284) y dos en E2 (residuos 416-430 y 600-620) concordantes en parte con lo observado para los péptidos aislados. Estos datos apuntan hacia una cooperación necesaria de diferentes regiones de E1 y E2 en el proceso de fusión.

En consonancia con estos estudios, muy recientemente se ha comprobado que la proteína quimérica constituida por ambos ectodominios E1₃₄₀E2₆₆₁ presenta propiedades desestabilizantes de membranas tales como agregación de vesículas, mezcla de lípidos o liberación de contenidos acuosos. Estas propiedades son características de proteínas de fusión [286].

Estos efectos se aprecian preferentemente a pH ácido y se ven alterados por la presencia de una elevada carga iónica del medio lo cual sugiere la importancia de las interacciones electroestáticas. Además, estudios de polarización de fluorescencia muestran que la proteína recombinante aumenta la temperatura de transición de fase de fosfolípidos ácidos (PG) a pH 5.0 y reduce su amplitud lo cual sugiere que la proteína está insertada en la membrana. Estudios de fluorescencia muestran un cambio conformacional a pH ácido reflejado en una variación de los residuos aromáticos hacia un entorno más hidrofílico [286].

A partir de estos estudios y de otros anteriores se ha postulado un modelo para la fusión del HCV con la membrana celular. La disociación del dímero E1-E2 como consecuencia del cambio conformacional promovido por la disminución del pH en el endosoma dejaría al descubierto los péptidos de fusión de estas proteínas. Estas regiones hidrofóbicas están altamente protonadas permitiendo su interacción con las cabezas polares negativas de fosfolípidos ácidos de la bicapa lipídica y se insertarían en la misma para alcanzar un estado energético más estable desestabilizando la membrana y conduciendo finalmente a la fusión de las membranas viral y celular [286] (figura 20).

Además de los péptidos fusogénicos, existen otras regiones implicadas en la fusión, tal y como se ha descrito para otras proteínas de fusión de tipo II. Así, la región

STEM de E2 (residuos 652-715) podría estar implicada en la reorganización de los complejos de glicoproteínas que tienen lugar durante la fusión [287]. Mediante la sustitución de algunos residuos por Trp se ha descrito que los dominios transmembrana de ambas glicoproteínas están implicados, de algún modo, en dicho proceso [173].

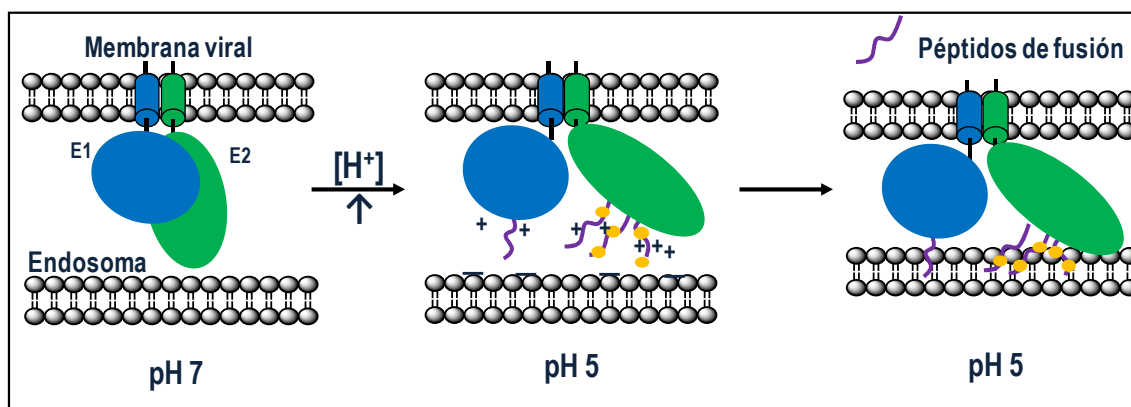


Figura 20. Modelo de fusión mediado por las glicoproteínas de la envoltura del HCV. La modificación del entorno de las proteínas hacia un pH ácido supone la exposición de los diferentes péptidos fusogénicos alojados en E1 y E2. Estos péptidos son los encargados de mediar la fusión con la membrana de la célula hospedadora debido al previo reconocimiento por el receptor y a la interacción entre cargas positivas (péptidos) y negativas (cabezas de los fosfolípidos).

Con respecto a la relación entre oligomerización y capacidad fusogénica, se ha propuesto la posibilidad de que las glicoproteínas E1 y E2 formen agregados covalentes ordenados con una alta estabilidad y resistentes a pH ácido [276]. Sólo en el momento de la unión a los receptores de la célula diana, en concreto la interacción con CD81, mediaría un cambio conformacional en las proteínas que permitiría la fusión con la membrana dependiente de pH ácido [236], dando lugar a un estado metaestable capaz de mediar la fusión que desembocaría en un estado de E1-E2 estable con menor energía [181] (figura 21). Además, la estabilización de E1-E2 mediante puentes disulfuro puede estar reemplazando la necesidad de un corte proteolítico de la glicoproteína acompañante, manteniendo el virión ajeno a la fusión hasta que se alcanza la membrana plasmática o la enzima disulfuroisomerasa asociada a endosomas [181].

Por otro lado, los lípidos también juegan un papel importante en el proceso de fusión. La presencia de colesterol en las membranas diana aumenta la fusión [223], y su ausencia inhibe la infección por el HCV [232]. Es más, se ha descrito la presencia de ApoE como una lipoproteína esencial requerida para la producción de partículas del HCV infectivas [181]. De la misma manera, la eliminación del colesterol de la

membrana viral da lugar a una infectividad muy baja [288]. Curiosamente, la esfingomielina tiene un gran efecto potenciador de la fusión del HCV cuando las membranas diana presentan colesterol [278], y la presencia de este lípido en la membrana viral juega un papel fundamental en la infectividad del HCV [288].

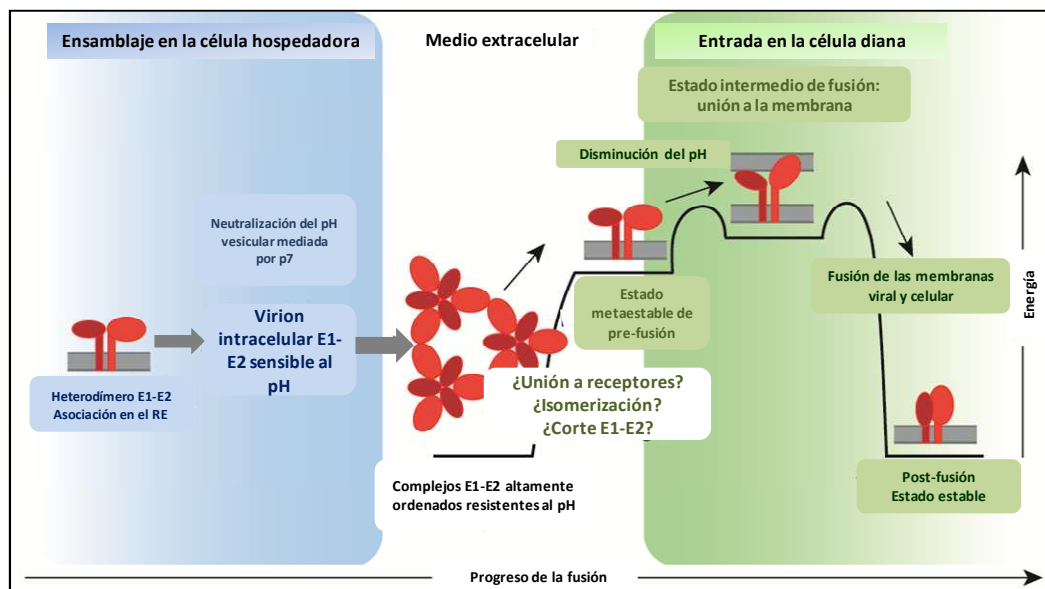


Figura 21. Modelo hipotético de reordenamiento de E1E2 necesario para mediar la fusión viral. Una vez que el virión está ensamblado y es liberado, los heterodímeros E1-E2 se reorganizan en complejos grandes unidos covalentemente. Estos complejos son resistentes al pH y necesitan un desencadenante antes de ser susceptibles a cambios de la acidez del medio que produzcan la fusión. Una vez reorganizados, los heterodímeros disminuyen su estado energético mediando la fusión de las membranas viral y celular. Adaptada de [181].

1.6.3. REPLICACIÓN

El HCV modula el metabolismo lipídico y altera el sistema de endomembranas para crear un entorno rico en lípidos favorable para la replicación viral. La replicación del RNA está fuertemente influida por los niveles intracelulares y la composición de ácidos grasos incluyendo el colesterol [289].

La replicación del HCV se lleva a cabo en unas estructuras vesiculares denominadas redes membranosas (figura 22), cuya formación parece ser inducida por la proteína NS4B [97, 290]. Las redes membranosas derivan de las membranas del RE [291], y son ricas en colesterol y ácidos grasos cuyo grado de saturación modula la replicación del HCV [292]. Varios estudios han identificado diferentes cofactores celulares para la replicación del HCV [293-295]. Entre estos factores, la PI4KIII α (Fosfatidil Inositol 4 Quinasa III α), una quinasa lipídica de la ruta de secreción temprana, juega un papel fundamental en la replicación del HCV [294, 296, 297]. La

ausencia de actividad de esta enzima induce cambios drásticos en la morfología ultraestructural de las redes membranosas del HCV. GFB-1, un factor de intercambio de guanina para GTPasas pequeñas de la familia Arf, es otro factor celular crítico para la replicación del HCV que podría participar en la ultraestructura de la red membranosa [298]. Además, se ha propuesto que los microtúbulos y los filamentos de actina están implicados en el movimiento del complejo de replicación del HCV a otras regiones de la célula, a través de interacciones moleculares con NS3 y NS5A [299].

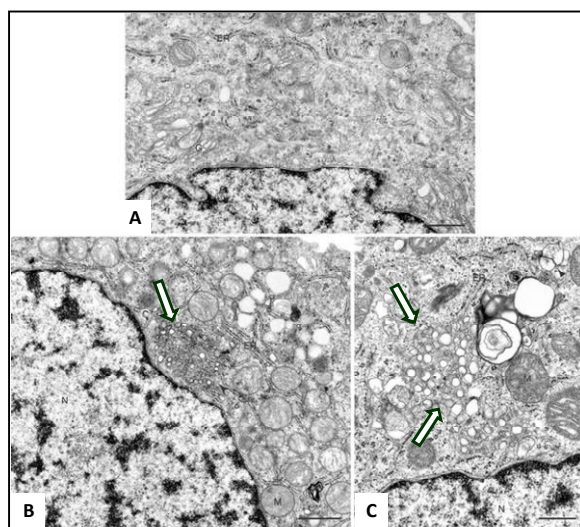


Figura 22. Alteraciones en las células Huh7 producidas por la incorporación de un replicón subgenómico. A) Célula Huh7 sin transfectar que muestra orgánulos subcelulares inalterados. Barra de escala 1 μ m. B) Célula Huh7 transfectada. La formación de la red membranosa se observa claramente en las proximidades del retículo endoplásmico, indicada por flechas. Barra de escala 1 μ m. C) Ampliación de la red membranosa. Se puede observar la formación a partir de pequeñas vesículas embebidas en la matriz de la membrana. Barra de escala 500 nm. N corresponde al núcleo, M a las mitocondrias, G al Golgi y ER al retículo endoplásmico. Adaptada de [98].

Appel y col. [300] propusieron un modelo de replicación del HCV en el cual, tras la infección y liberación del RNA viral en el citoplasma, las proteínas del HCV se generan a través de la traducción del genoma mediada por el IRES. Dicho proceso tiene lugar en el RE rugoso donde la peptidasa señal y las proteasas virales catalizan la proteólisis de la poliproteína. La formación de vesículas, que se acumulan para formar la red membranosa, es inducida por NS4B junto con factores celulares y virales (NS5A). Posteriormente, NS5B, junto con factores virales adicionales (NS3/4A, NS5A), y factores celulares, se ensambla al extremo 3' de la cadena de RNA positivo con el fin de iniciar la síntesis *de novo*. La nueva cadena de RNA negativo generada sirve como molde para producir un exceso de cadenas de RNA positivas, que será utilizado para la traducción, para nuevas rondas de replicación, o para ser empaquetado en partículas virales.

1.6.4. ENSAMBLAJE VIRAL Y LIBERACIÓN

El requisito indispensable para que se produzca el ensamblaje es el correcto procesamiento proteolítico de la proteína Core por la peptidasa péptido señal liberándose el dominio C-terminal que actúa así como péptido señal para E1. Este corte desencadena la traslocación de la proteína Core a la superficie de las LDs [59] y el consecuente desplazamiento de la proteína ADRP (del inglés “Adipose Differentiation Related Protein”) [301]. Este proceso de exclusión supone la degradación de dicha proteína produciéndose el transporte de las LDs a los sitios de replicación de HCV dirigidas por microtúbulos [301-303].

Por lo tanto, el proceso de ensamblaje viral se puede dividir en dos pasos: (1) formación de la nucleocápsida y (2) formación de la envoltura e incorporación lipídica [304] (figura 23).

- Paso (1): El dominio DI de la proteína Core está implicado en la interacción con el RNA viral y en la formación de dímeros estables. Esta oligomerización constituye un requisito previo para el ensamblaje de la nucleocápsida [305-308]. Se ha determinado que el dominio D2 de Core le proporciona su capacidad para localizarse en los LDs [309, 310]. Un segundo determinante para la asociación Core-LD es la secuencia carboxilo terminal de Core, que permite que la proteína E1 se dirija al retículo endoplásmico. La proteína Core induce la recolocación de los LDs desde una distribución dispersa en el citosol a una región perinuclear [301]. El RNA viral es replicado en la redes membranosas, localizadas en la región perinuclear, y la redistribución de los LDs podría crear el entorno lipídico necesario en el que los elementos estructurales y no estructurales implicados en el ensamblaje puedan interactuar [60].

- Paso (2): Varios estudios han demostrado que la maduración y la liberación de las partículas del HCV están estrechamente relacionadas con la vía de VLDL [226-228]. La formación de la envoltura e incorporación lipídica del HCV podría tener lugar en unos microdominios especializados y ricos en lípidos en la membrana del RE, enriquecidos por LDs y en los que se sintetizan los LDs lumbinales, que son los precursores de las VLDL. Durante el ensamblaje la nucleocápsida puede ser introducida en el núcleo de los LDs lumbinales. No se sabe con certeza cómo las proteínas de la envoltura se dirigen a los sitios de ensamblaje y se incorporan en los viriones. Se asume que NS2 sola, o junto con p7, establece interacciones con el complejo de replicación y las proteínas de la envoltura [311, 312]. Otros estudios demuestran que NS2 podría poner en contacto las proteínas de la envoltura, p7 y las proteínas no estructurales NS3 y NS5A [88, 89]. El proceso por el que las apolipoproteínas se

incorporan a las partículas maduras no se conoce. Estas partículas, conteniendo ApoB y ApoE, serían transportadas siguiendo la ruta de secreción de VLDL.

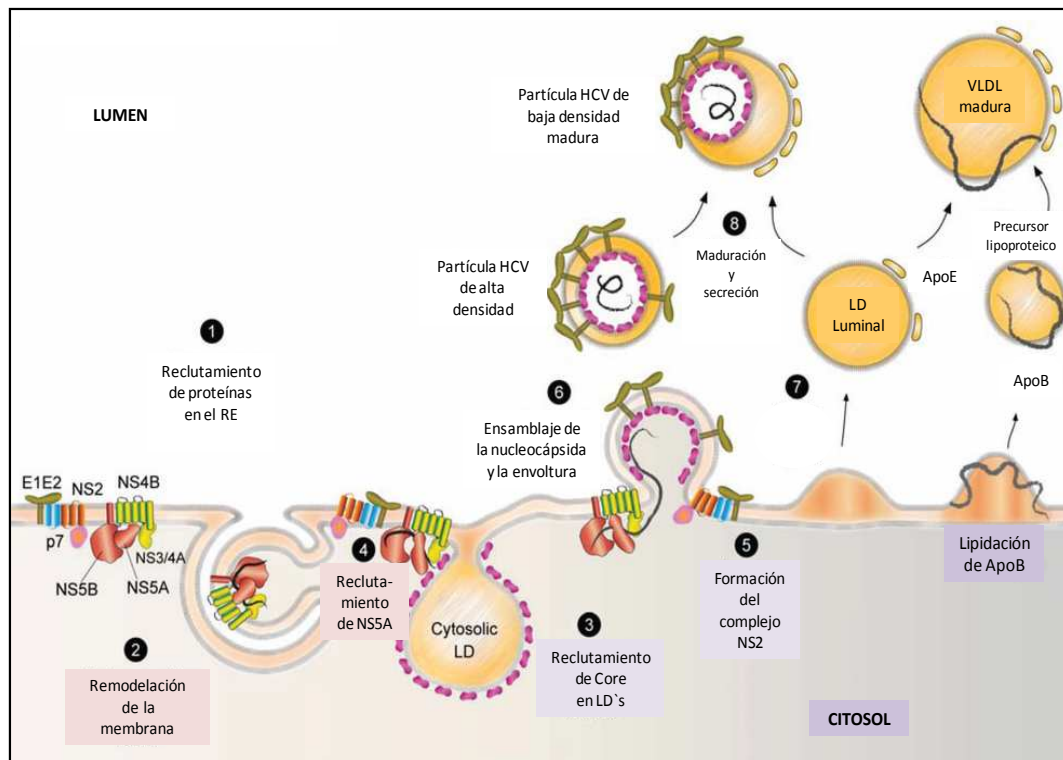


Figura 23. Replicación del HCV y ensamblaje en el retículo endoplásmico. (1) Las proteínas maduras, una vez procesadas y asociadas a la membrana del retículo se ensamblan en complejos. El complejo NS2 consiste en las glicoproteínas de la envoltura E1 y E2, p7 y la propia proteasa NS2. (2) El complejo de replicación está formado por la proteasa NS3 y su cofactor NS4A, NS4B, NS5A y NS5B, que se encuentran asociados a membranas modificadas formando la red membranosa. (3) Las proteínas Core diméricas se ensamblan recubriendo las LDs que posteriormente reclutarán NS5A y las proteínas asociadas (4). (5) Los complejos NS2 interaccionan entonces con los complejos de replicación acumulados en las proximidades de los LDs produciéndose el ensamblaje de la nucleocápsida y de la envoltura (6). (8) La asociación de las partículas virales de alta densidad inmaduras con LDs luminales (7) supone la producción de partículas virales maduras preparadas para secretarse. La asociación de estas LDs luminales con precursores proteicos compuestos por ApoB asociada a lípidos junto con la unión de ApoE supone la generación de VLDL maduras. Adaptada de [44].

1.7. RESPUESTA INMUNE FRENTE A LA INFECCIÓN

Tras la infección aguda por el HCV, aproximadamente el 20% de las personas infectadas es capaz de eliminar el virus espontáneamente [313]. Los mecanismos exactos para esta eliminación no se conocen, pero parece que múltiples componentes del sistema inmune, tanto innato como adaptativo, juegan un papel fundamental en este proceso.

Para muchos virus se ha demostrado que la respuesta inmune innata, y más concretamente los interferones tipo 1 (IFN1), son la primera línea de defensa limitante de la replicación y la expansión viral, determinando que una infección sea aguda o crónica [314]. Dada la importancia de esta defensa, los virus han desarrollado numerosas estrategias para contrarrestarla, incluyendo el bloqueo de la inducción de IFNs, la interferencia con señales desencadenadas por IFNs o la inhibición de la acción de genes estimulados por interferones (ISGs) [314]. En el caso del HCV, se ha demostrado que la proteasa NS3/4A corta proteolíticamente dos moléculas clave para la inducción de la transcripción de ISGs: MAVS, una proteína adaptadora que transmite la señal desde el sensor de RNA RIG-I hasta el factor de transcripción IRF-3; y TRIF, un adaptador requerido para la señalización desde el sensor de RNA, receptor tipo toll (TLR)-3, hasta IRF-3 [315, 316]. Por ello, las células infectadas por el HCV no son capaces de producir IFN1. Otro mecanismo adicional por el cual el HCV podría atenuar la respuesta inmune innata es el bloqueo de la traducción del RNA a través de RNA de doble cadena activado por la proteína quinasa R (PKR) [317]. Estudios recientes han identificado un grupo de polimorfismos asociados al gen que codifica IFN- γ (o IL-28B) en el hospedador que es importante para la determinación de la eliminación espontánea del virus durante la infección aguda y en la respuesta frente a la terapia estándar IFN/ribavirina [318-321], aunque el mecanismo por el cual el IFN- γ actúa en el ciclo del HCV no ha sido todavía dilucidado.

La mayoría de estudios realizados hasta el momento señalan que las células T CD4⁺ y CD8⁺ tienen papeles cruciales, aunque distintos, en la determinación del resultado de la infección por el HCV [322]. Las células T CD8⁺ son las células efectoras primarias que median la inmunidad frente al HCV, mientras que las células T CD4⁺ participan en el control a largo plazo del virus y son requeridas para el mantenimiento de la función de las células T CD8⁺ [323, 324]. Durante la infección aguda se detectan respuestas inmunes adaptativas fuertes y amplias que persisten en los pacientes que resuelven la infección. En cambio, en los pacientes con infección persistente la respuesta específica de células T frente al virus es débil o indetectable. Estudios inmunogenéticos han demostrado una asociación entre diferentes alelos HLA de clases I y II y la eliminación del virus [325, 326]. Además, estudios realizados con pacientes con infección crónica demuestran que la respuesta de las células T CD4⁺ y CD8⁺ está bloqueada [327, 328] (figura 24).

Los anticuerpos circulantes frente al HCV son detectables hasta 1 a 3 meses después de la infección [329] y parecen ser un componente importante en el control del virus en las primeras etapas de la infección. Existe una correlación directa entre la eliminación del virus durante la fase aguda y la rápida inducción de elevados títulos de anticuerpos circulantes neutralizantes [330]. Sin embargo, los anticuerpos neutralizantes también se encuentran en altos títulos en los pacientes crónicos, y en

este caso obviamente no son capaces de controlar la infección [142]. Las proteínas de la envoltura, que son los principales objetivos de los anticuerpos neutralizantes, presentan los mayores niveles de variabilidad genética del virus, lo que permite al virus la evasión de estos anticuerpos [257]. Hay otros mecanismos por los cuales el HCV evade la respuesta inmune humoral como la transferencia directa del virus mediante contactos célula-célula [331], la inducción de anticuerpos que interfieren con los anticuerpos neutralizantes [257, 332], y la protección de los epítomos neutralizantes por glicosilación de determinados residuos de las proteínas de la envoltura [333].

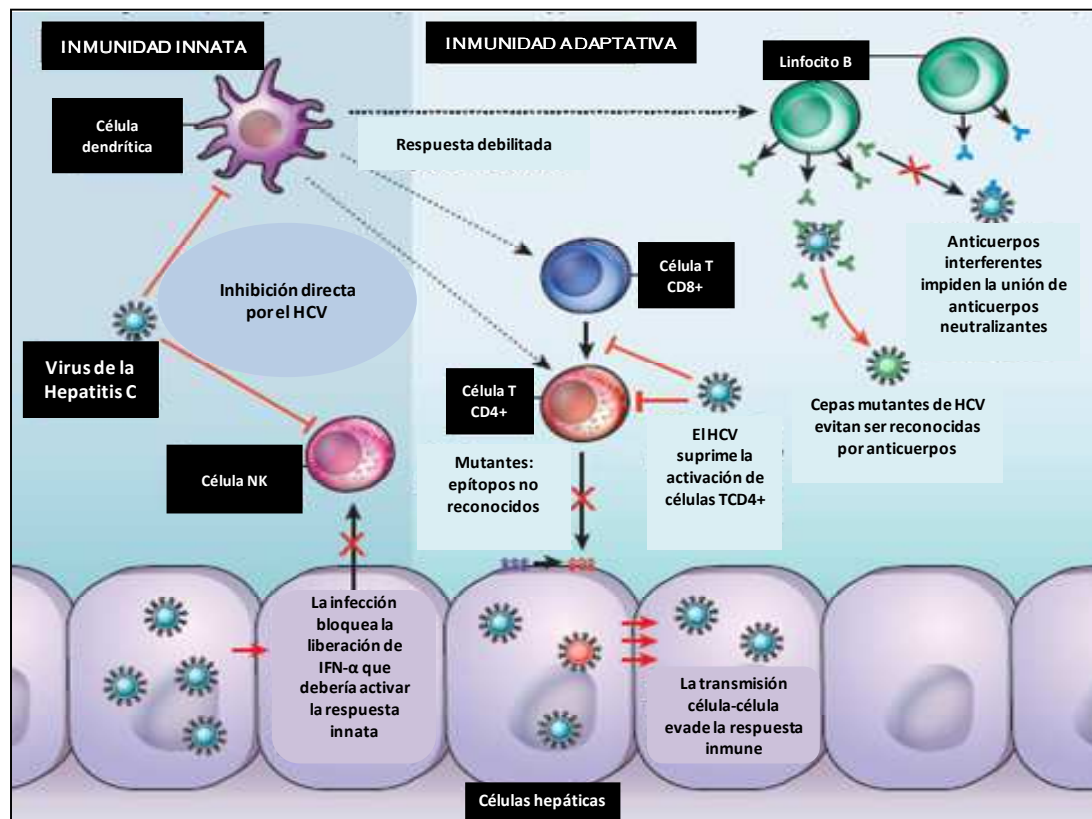
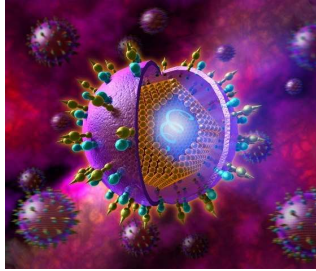


Figura 24. Representación de la respuesta inmune frente al HCV. La imagen representa tanto la respuesta innata, basada en la acción de las células dendríticas y de las NK (del inglés "Natural Killer"), como la adaptativa, basada en la producción de anticuerpos, y cómo el virus es capaz de evadir las diferentes vías (líneas negras) o suprimirlas (líneas rojas). Adaptada de [334].



OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Han sido numerosos los estudios que han revelado el papel fundamental de las glicoproteínas E1 y E2 de la envoltura del virus de la hepatitis C, tanto en el reconocimiento de las células hepáticas como en la entrada del virus en las mismas. Esto las ha convertido en el objetivo principal a la hora de desarrollar una vacuna frente a un virus que causa en torno a 350 000 muertes al año. Sin embargo, la falta de conocimiento del modo por el cual actúan estas proteínas, ha hecho imposible, hasta el momento, desarrollar ningún mecanismo de inmunización frente a la infección por HCV. La dificultad para producir las glicoproteínas completas E1 y E2 aisladas, así como la ausencia de datos concluyentes sobre su estructura, ha impedido la obtención de anticuerpos que neutralicen dicha infección.

E1 y E2 son glicoproteínas ancladas a membrana que interaccionan en la superficie viral dando lugar a heterodímeros E1-E2 que pierden su funcionalidad al eliminar cualquiera de las dos proteínas. Por homología con otros virus de la misma familia, se ha postulado que E2 sea la proteína implicada en el reconocimiento de los receptores y que contenga la actividad fusogénica, comportándose E1 como proteína acompañante que actuaría como chaperona. Sin embargo, ha sido descrita una región de E1 con características de péptido fusogénico lo cual ha supuesto un replanteamiento sobre el verdadero mecanismo de fusión del HCV.

Con el fin de contribuir a la elucidación del mecanismo fusogénico del HCV, el **primer objetivo** de este trabajo ha consistido en analizar el papel que desempeña la región 268-292 de E1, descrita como posible péptido fusogénico, en el contexto del complejo E1-E2. Para ello, se llevará a cabo la caracterización estructural, antigénica y funcional de una quimera mutante de los ectodominios E1 y E2 en la que se elimina el péptido fusogénico, E2E1_{Δ268-292}. Asimismo, se comprobará como afecta la eliminación de esta región a la formación y capacidad de entrada de pseudopartículas infectivas HCVpp.

Por otro lado, se desconoce cuál es el mecanismo de interacción entre las glicoproteínas ancladas a membrana, E1 y E2, para formar heterodímeros funcionales, ya que no se ha observado ningún tipo de interacción covalente entre ellas. A este respecto, se ha destacado la importancia de los dominios transmembrana de ambas proteínas en el mantenimiento de la interacción.

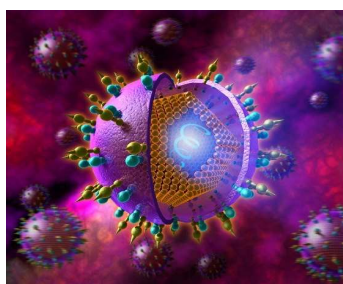
Con el fin de caracterizar las bases moleculares de la interacción entre los dominios transmembrana de E1 y E2, se planteó como **segundo objetivo**, el estudio de

distintos mutantes puntuales en las regiones de anclaje de E1 y E2 utilizando tres metodologías diferentes:

- Sistema de traducción-glicosilación *in vitro* con proteínas derivadas de la *Leader peptidase* (Lep). Se determinará la capacidad de inserción de un segmento transmembrana en una bicapa lipídica. Con base en estos ensayos, se pretende, además, determinar con precisión el residuo que ocupa la primera posición real en el interior de la membrana.

- Reconstitución de la proteína Venus en células HeLa. Se determinará la interacción de los dominios transmembrana de E1 y E2 anclados a dos regiones complementarias de la proteína fluorescente.

- Producción de pseudopartículas de HCV mutantes. Se comprobará cómo afectan las distintas mutaciones a la incorporación de E1 y E2 en la superficie y a la capacidad de entrada de estas HCVpp en las células diana Huh7.



MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES

3.1. MICROORGANISMOS

3.1.1. CEPAS DE *E. COLI*

- **DH5 α F'**: F'endA1hsdR17(r⁻k,m⁺k) supE44 λ thi-1recA1gyrA(Nal^r)relA1 Δ (lacI ZYA-argF) U169deoR [ϕ 80 dlac Δ (lacZ) M15]. Cepa utilizada para la clonación de los distintos DNAs codificantes. Permite la comprobación de colonias azules/blancas en placas que contienen X-galactosa.

3.1.2. LÍNEAS CELULARES DE INSECTO

- **Sf9**: esta línea celular deriva de las células IPLB-Sf21-AE de *Spodoptera frugiperda*. Las células Sf9 se adaptan al cultivo en suspensión en medio libre de proteínas Insect X-press para la expresión transitoria o mantenida de proteína recombinante. Estas células poseen las siguientes características:

- El tiempo de duplicación varía de 18 a 30 horas hasta una densidad máxima de $8\text{-}12 \times 10^6$ células/ml en medio Insect X-press (BioWhittaker).
- Pueden ser utilizadas en cultivos en monocapa para cotransfección, en ensayos en placa para la purificación de *baculovirus* recombinantes o incluso para la propagación de *baculovirus* y producción de proteínas recombinantes. Esto último también se puede llevar a cabo usando las células en cultivos en suspensión.

- **High Five o Tni**: las células High Five (BTI-TN-5B1-4) derivan de la línea celular parental de *Trichoplusia ni* (Tni). Estas células son comúnmente utilizadas para la obtención de proteínas recombinantes cuando se usa el sistema de expresión basado en *baculovirus*. Además, al igual que las Sf9, pueden crecer en medio Insect X-press en cultivos en monocapa, aunque su crecimiento y mantenimiento no son tan eficaces en cultivos en suspensión como en el caso de las células Sf9.

Ambas líneas celulares se cultivaron en monocapa a 27 °C utilizando el medio Insect X-press (BioWhittaker) con gentamicina a 10 μ g/ml.

3.1.3. LÍNEAS CELULARES DE MAMÍFERO

- **Huh7**: línea celular derivada de hepatoma humano cedida por la Dra. Catherine Schuster del Instituto de Virología de Estrasburgo (Francia). Es una línea celular inmortal de células tipo epiteliales tumorigénicas. Estas células son receptivas a la infección por algunos virus, como el virus de la hepatitis C, para el cual presentan

receptores, y han sido usadas como modelo para estudiar la interacción del HCV con los hepatocitos.

- **HEK 293T:** línea celular derivada de células embrionarias de riñón humano. Células de fácil mantenimiento en cultivo y con gran eficacia de transfección. Contienen el antígeno grande T de SV40 (del inglés “Simian Vacuolating Virus 40”; virus 40 vacuolado de simio), lo que permite la replicación episomal de plásmidos transfectados que contengan el origen de replicación de SV40, dando lugar a su amplificación y a la expresión temporal extendida de los productos génicos de interés.

- **HeLa:** línea celular derivada de una muestra de cáncer cérvico-uterino. Son células inmortales con una elevada tasa de crecimiento en cultivo. Han sido utilizadas para el estudio de la capacidad de interacción de los dominios transmembrana así como para determinar su localización subcelular. Fueron cedidas amablemente por la Dra. María Antonia Lizarbe.

Todas estas células son mantenidas en monocapa a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5% y con un 98% de humedad.

3.2. VECTORES PLASMÍDICOS

3.2.1. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN *BACULOVIRUS*

- **pAcGP67-A** (Pharmlingen): este plásmido contiene la secuencia señal gp67 incluida tras el sitio de clonación múltiple, de tal forma que, al ser clonado el gen de interés en dicho sitio, la proteína codificada por dicho gen será expresada, como proteína de fusión conteniendo el péptido señal gp67, bajo el control del promotor fuerte del gen de la polihedrina. Este péptido media la secreción de la proteína recombinante al medio extracelular, siendo eliminado en el proceso de transporte de la proteína hacia el exterior de la célula. Así, la proteína es fácilmente purificada a partir del medio de cultivo cuando éste no contiene proteínas adicionales.

3.2.2. PRODUCCIÓN DE PSEUDOPARTÍCULAS VIRALES EN CÉLULAS HEK 293T

- **pMLV-Gag-Pol:** vector que permite expresar proteínas de estructura retroviral bajo el control del promotor CMV (Citomegalovirus). Los genes *gag* y *pol* del virus de la leucemia de ratón, MLV (del inglés “Murine Leukemia Virus”), codifican las proteínas de la cápsida, y la transcriptasa inversa y la integrasa, respectivamente.

- **pMLV-Luc:** vector que contiene el gen de la luciferasa bajo el control del promotor CMV que permite determinar la actividad transcripcional en células que son transfectadas con este vector.

La construcción de estos dos vectores ha sido descrita previamente [69]. Ambos plásmidos fueron cedidos amablemente por el Dr. François-Loïc Cosset de la Escuela Normal Superior de Lyon (ENSL, Lyon, Francia).

- **pcDNA 3.1(+)-zeo (Invitrogen):** vector diseñado para la expresión en células de mamífero. Contiene el promotor potenciador (CMV) para la expresión en altos niveles, y el origen de SV40 para la replicación episomal y el rescate de vectores simples en líneas celulares que expresan el antígeno grande T. Posee el gen de resistencia a ampicilina, el origen de replicación pUC para la selección y mantenimiento en *E. coli* y el gen de resistencia a zeocina que permite la selección de células transfectadas y la posibilidad de mantener una línea transfectada estable.

3.2.3. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INSERCIÓN EN MEMBRANA

- **pGEM1-Lep:** vector derivado de pGEM1-T (Promega) diseñado para llevar a cabo estudios de integración de segmentos transmembrana en reticulocitos. Contiene el gen modificado de Lep (del inglés “Leader Peptidase”) con dos sitios de glicosilación situados 130 aminoácidos por delante del sitio de clonación múltiple y 23 por detrás, de modo que el segmento transmembrana de estudio quede flanqueado. Posee el gen de resistencia a ampicilina para su amplificación y purificación en células *E. coli*. Este plásmido fue amablemente cedido por el Dr. Ismael Mingarro de la Universidad de Valencia.

3.2.4. ESTUDIOS DE COMPLEMENTACIÓN DE GFP

- **pBiFC-VN155(I152L):** vector que contiene la región N-terminal de la proteína Venus derivada de GFP hasta el residuo 155 conteniendo la mutación I152L que potencia la señal de fluorescencia aumentando la relación señal/ruido [335]. Contiene el gen de resistencia a ampicilina y el promotor potenciador (CMV) para la expresión en altos niveles.
- **pBiFC-VC155:** vector que contiene la región C-terminal de la proteína Venus derivada de GFP desde el residuo 155 hasta el 238. Contiene el gen de resistencia a ampicilina y el promotor potenciador (CMV) para la expresión en altos niveles.

Ambos plásmidos fueron cedidos amablemente por el Dr. Ismael Mingarro de la Universidad de Valencia.

3.3. MEDIOS DE CULTIVO

3.3.1. MEDIO DE CULTIVO DE *E. COLI*

- **LB** (1 L): 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de cloruro sódico. Utilizado para el crecimiento de bacterias en medio líquido. Para el crecimiento de las mismas en medio sólido se añadió agar a 15 g/L.
- **2XYT** (1L): 16 g de bacto-triptona, 10 g de extracto de levadura y 5 g de cloruro sódico. Medio utilizado para la preparación de bacterias competentes.

3.3.2. MEDIO DE CULTIVO DE *BACULOVIRUS*

- **MEDIO INSECT X-PRESS** (BioWhittaker): Medio enriquecido con L-glutamina y carente de proteínas. Es utilizado para el crecimiento y mantenimiento de células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) y de *Trichoplusia ni* (Tni), así como para la producción a gran escala de proteína recombinante. Permite el cultivo celular en suspensión y en monocapa.

3.3.3. MEDIO DE CULTIVO DE CÉLULAS EUCARIOTAS

- **DMEM**: Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Las células Huh7 fueron crecidas en DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, gentamicina a 50 µg/ml, piruvato sódico 1 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM y L-glutamina 2 mM. Las células HEK 293T y las células HeLa fueron crecidas en medio DMEM suplementado con un 10% de suero fetal bovino, penicilina/estreptomicina 100 U/ml, y L-glutamina 2 mM.

3.4. DISOLUCIONES DE USO GENERAL

- **PBS** (tampón fosfato salino): NaCl 0.14 M, KCl 2.7 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, pH 7.4.
- **PBST**: tampón PBS con Tween 20 al 0.05% (v/v).
- **TAE**: Tris-acetato 0.04 M (4.84 g/L de Tris base y 1.14 ml/L de ácido acético glacial), EDTA 1 mM, pH 8.0.
- **Tampón de aplicación 6x** (electroforesis de DNA): azul de bromofenol 0.25% (p/v), cianol de xileno 0.25% (p/v) y glicerol 30% (v/v).
- **Tampón para geles de poliacrilamida**: Tris 0.025 M, pH 8.3, Gly 0.192 M y SDS 0.1% (p/v).
- **Tampón de electrotransferencia de proteínas**: Tris 48 mM, pH 9.0, Gly 39 mM, SDS 0.037% (p/v) y metanol 20% (v/v).

- **Tampón de aplicación 1x** (electroforesis de proteínas): Tris 50 mM pH 7.6, EDTA 2 mM, SDS 1% (p/v), glicerol 10% (v/v) y azul de bromofenol 0.02% (p/v).
- **Tampones para la preparación de bacterias competentes:**
 - a) **RF1:** RbCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM, acetato potásico 30 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol al 15% (p/v), pH 5.8.
 - b) **RF2:** Mops 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM, glicerol al 15% (p/v), pH 6.8.
- **Medium buffer:** Tris 5 mM, ácido cítrico 5 mM, MES 5 mM, EDTA 1 mM y NaCl 0.1 M.
- **Tampones de cotransfección de células de insecto Sf9:**
 - a) **Tampón de transfección A** (Pharmingen): Medio Grace suplementado con un 10% de suero fetal bovino a pH 6.0-6.2.
 - b) **Tampón de transfección B** (Pharmingen): Tampón hepes, pH 7.1, CaCl₂ 125 mM y NaCl 140 mM.

4. MÉTODOS

4.1. TÉCNICAS DE GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

4.1.1. AMPLIFICACIÓN DE DNA POR PCR

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Gene Amp System 2400 (Perkin-Elmer). En todos los casos se utilizaron 50 µl de una mezcla de reacción conteniendo: dNTPs (10 µM cada uno), cebadores (1 µM cada uno), la enzima Pfu DNA-polimerasa (Promega) junto con su tampón comercial y el DNA molde. En cada caso se ha utilizado el programa de PCR adecuado para obtener el producto deseado atendiendo a las temperaturas de desnaturalización de los cebadores y a la longitud de los fragmentos de DNA a amplificar.

Las mutaciones puntuales generadas en los diferentes cDNAs han sido llevadas a cabo utilizando el método Quick Change. Este método se basa en una PCR en la cual los cebadores son absolutamente complementarios e introducen pequeñas variaciones de nucleótidos en el centro de los mismos. Las condiciones de reacción son las mismas estipulando un tiempo de elongación de 1 minuto por cada 1000 pares de bases que contenga el plásmido. El resultado es la obtención de varias copias del plásmido mutado mellado por lo que no será digerido con el tratamiento posterior con la enzima de restricción *DpnI* que sólo digerirá los plásmidos superenrollados usados como molde, pudiendo así usarse la mezcla de digestión inactivada directamente para transformar células competentes.

4.1.2. ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA

Los geles de agarosa se preparan al 0.7-2% (p/v), según sean los tamaños del DNA a separar, en tampón TAE. A las muestras se les añade la cantidad necesaria de tampón de aplicación 6x. En todos los casos se utilizan patrones de masa molecular de diferentes tamaños (patrón "REAL" de REAL-Durviz). Las electroforesis se desarrollan a un voltaje constante de 80-100 V, siendo su duración variable dependiendo del tamaño del DNA. Los geles de agarosa se tiñen con una disolución de bromuro de etidio (0.5 µg/ml) observándose los resultados bajo luz ultravioleta.

4.1.3. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA

La purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa se llevó a cabo con el sistema de extracción Wizard® PCR preps de Promega, siguiendo las

condiciones indicadas por el fabricante o con el sistema de extracción GenElute™ Gel Extraction Kit de Sigma para fragmentos inferiores a 200 pb.

4.1.4. DIGESTIÓN DE DNA CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Las digestiones de plásmidos y fragmentos de DNA se llevaron a cabo mediante incubación durante un mínimo de 2 h a 37 °C o durante 16 h a 20 °C en el tampón específico para cada enzima y utilizando ocasionalmente BSA (1 mg/ml) si la enzima lo requiere. Se utilizaron enzimas de restricción de Roche, de New England y de Thermo Scientific.

4.1.5. LIGACIONES

Para conseguir la inserción del DNA codificante de interés en el vector de clonación adecuado se utilizó la ligasa T4 (Fermentas). Así, las ligaciones se realizan tomando 0.3 µl de la ligasa, 2 µl de tampón 10x, cantidades variables de inserto y plásmido dependiendo de sus concentraciones relativas, completando hasta 20 µl finales con agua destilada. La mezcla final se incubaba a 17 °C durante 12-18 horas.

4.1.6. SECUENCIACIÓN DE DNA

La secuenciación de los distintos DNAs codificantes en los plásmidos recombinantes se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación de la Universidad Complutense de Madrid, utilizando tanto oligonucleótidos comerciales complementarios de las regiones que flanquean los insertos como los diseñados en cada caso particular preparados por Sigma.

4.2. MANIPULACIÓN DE DNA PLASMÍDICO BACTERIANO

4.2.1. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *E. coli*

Las bacterias competentes, utilizadas para las pertinentes transformaciones, fueron preparadas siguiendo el protocolo que se especifica a continuación:

- 1) Se crece una colonia fresca en 5 ml de LB a 37 °C con agitación durante toda la noche.
- 2) Se inoculan 250 ml de 2XYT con 2.5 ml del preinóculo. Se crecen en un erlenmeyer de 2 litros a 37 °C y con fuerte agitación, hasta lograr una DO₆₀₀ de 0.5, transvasándose a hielo.
- 3) Las células se centrifugan a 4 °C, 5000 rpm, durante 10 minutos. A partir de este punto se trabaja a 4 °C.

- 4) El sedimento de células se seca bien con una torunda estéril o con una centrifugación adicional.
- 5) El sedimento de células bien seco se resuspende completamente en 80 ml de RF1 a 4 °C.
- 6) Se centrifuga durante 10 minutos, a 4 °C y a 5000 rpm.
- 7) El sedimento se vuelve a resuspender en 20 ml de RF2 a 4 °C.
- 8) Incubar en hielo durante 15 minutos.
- 9) Finalmente las células se distribuyen en alícuotas de 0.2 ml en tubos estériles y fríos. Se conservan a -80 °C.

4.2.2. TRANSFORMACIÓN DE *E. coli*

El protocolo de transformación utilizado fue el siguiente:

- 1) Se descongelan células competentes en hielo manteniéndose siempre en frío.
- 2) Se toma una alícuota de 200 µl de células competentes por transformación y se incuba con el DNA plasmídico durante 30 minutos en hielo.
- 3) Se someten las células a un choque térmico por incubación a 37 °C durante 45 segundos.
- 4) Tras enfriar durante 2 minutos en hielo, se añaden 800 µl de medio LB y se dejan incubando a 37 °C durante al menos 1 h para permitir la expresión del gen de resistencia correspondiente del plásmido insertado.
- 5) Finalmente se plaquean diferentes volúmenes (desde 50 µl hasta la totalidad de las células empleadas) en placas de LB con el antibiótico adecuado para la selección.

4.2.3. "MINIS" DE COLONIAS

Este método, proporcionado por el Dr. José Luis García López, permite analizar el tamaño de un DNA plasmídico por extracción a partir de un sedimento bacteriano y posterior electroforesis en gel de agarosa. Se utilizó para comprobar el tamaño de los plásmidos de las diferentes ligaciones. El protocolo utilizado fue el siguiente:

- 1) Se toman células de la placa utilizando un palillo o punta estéril y se transvasan a un tubo Eppendorf que contiene 40 µl de tampón de lisis (Tris 10 mM, pH 7.4-8.0, EDTA 10 mM, NaOH 0.1 M, SDS 1%).
- 2) Se añaden 3 µl de HCl 1 M para neutralizar y 5 µl de tampón de aplicación (6x) de geles de agarosa. Se incuba a -80 °C durante un mínimo de 15 min. En este paso el SDS precipita y arrastra el DNA cromosómico. A partir de este punto nunca se debe abandonar la cadena de frío para evitar la resuspensión del precipitado.

- 3) Se centrifuga en microfuga a 4 °C durante 8 min, manteniendo los tubos en hielo tras la centrifugación.
- 4) Se aplican 20 µl del sobrenadante en un gel de agarosa al 0.7%.

4.2.4. PURIFICACIÓN DE DNA PLASMÍDICO

Una vez seleccionados los plásmidos recombinantes, se procedió a purificarlos utilizando el sistema de purificación GenElute™ Plasmid miniprep Kit de Sigma, siguiendo las indicaciones del fabricante. El grado de pureza del DNA plasmídico se determinó por electroforesis en geles de agarosa al 0.7%.

4.3. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

4.3.1. EXPRESIÓN EN *BACULOVIRUS*

En la figura 25 se recoge un esquema del proceso seguido para la expresión de proteínas utilizando el sistema de expresión de *baculovirus*.

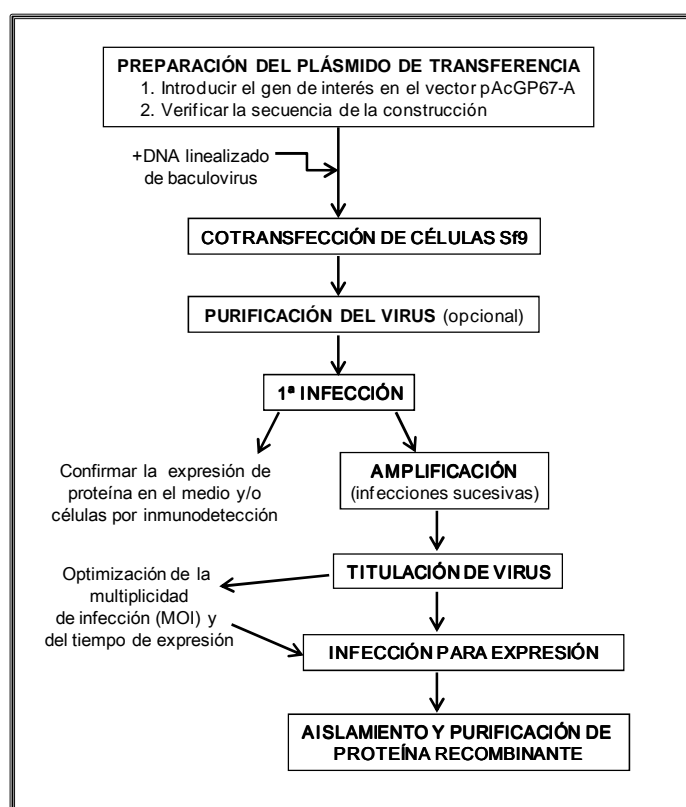


Figura 25. Guía esquemática de trabajo para la expresión de proteínas recombinantes con el sistema de *baculovirus*.

La ligación de fragmentos de DNA en el plásmido pAcGP67-A y la transformación de células competentes de *E. coli* DH5 α F' se realizó siguiendo el protocolo descrito anteriormente, seleccionando los plásmidos recombinantes en placas de LB/ampicilina (100 μ g/ml).

4.3.1.1. Generación de *baculovirus* recombinantes por cotransfección

Con el fin de conseguir *baculovirus* recombinantes se realiza la cotransfección de células Sf9 con el plásmido pAcGP67-A, que contiene el gen de interés insertado, junto con el DNA del virus linealizado, de manera que la recombinación homóloga *in vivo* entre el plásmido y el DNA viral transferirá el gen de interés al genoma viral. Para ello se sigue el protocolo de transfección BD BaculoGold:

- 1) Se siembran 2×10^6 células Sf9 en una placa de cultivos de 60 mm de diámetro. Inicialmente la confluencia del cultivo debe ser de un 50-70%.
- 2) El cultivo celular se mantiene durante 1-2 horas a 27 °C para permitir la adhesión de las células a la superficie de la placa de cultivo.
- 3) Se retira el medio de cultivo de la placa y se añade 1 ml del tampón de transfección A, de tal forma que toda la superficie de la placa quede cubierta completamente por dicho tampón para que las células estén permanentemente hidratadas.
- 4) Se mezclan, en tubo Eppendorf estéril de 1.5 ml, 0.5 μ g del genoma de *baculovirus* linealizado BD BaculoGold y 2 μ g de plásmido recombinante que contiene el gen de interés insertado. El DNA de *baculovirus* linealizado BaculoGoldTM es una forma modificada del DNA de *baculovirus* AcNPV (virus de la polihedrosis nuclear *Autographa californica*). Este DNA contiene una mutación letal que previene la formación de virus viables, excepto en el caso de que se produzca la recombinación homóloga con el plásmido pAcGP67-A que elimina dicha delección.
- 5) La mezcla se deja incubando durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- 6) Se añade a la mezcla de transfección 1 ml del tampón de transfección B y se agita con la pipeta favoreciendo la formación de burbujas.
- 7) Se añade 1 ml de la mezcla anterior sobre el cultivo de células Sf9 gota a gota agitando la placa suavemente para permitir la mezcla de la nueva disolución con el tampón de transfección A.
- 8) El cultivo celular se incubada a 27 °C durante 4 horas.
- 9) Se retira la mezcla de transfección de la placa y se lavan las células con 2 ml de medio de cultivo. Seguidamente se vuelven a añadir 2 ml de medio Insect X-press y se incuba la placa a 27 °C durante 5 días.

- 10) El sobrenadante resultante de la cotransfección puede ser utilizado para purificar los virus recombinantes generados en el proceso o directamente para amplificarlos y producir proteína recombinante.

4.3.1.2. Ensayo en placa

Este método es válido tanto para la purificación como para la titulación de un virus. Mediante la purificación de los *baculovirus* recombinantes se consigue aislar un único tipo de virus de una mezcla heterogénea inicial. La titulación de un virus permite conocer la cantidad de virus presente y así poder determinar la cantidad necesaria para utilizarlo posteriormente, bien para amplificarlo o para producir la proteína recombinante de interés. El protocolo seguido se detalla a continuación:

- 1) Se siembran 2×10^6 de células Sf9 en placas de 60 mm de diámetro (70-80% de confluencia).
- 2) Después de 1-2 horas a 27 °C las células quedan adheridas a la superficie de la placa.
- 3) Se realizan diluciones seriadas (10^{-4} - 10^{-7}) del sobrenadante de la cotransfección y, tras retirar el medio, se añaden 0.5 ml de cada dilución sobre el cultivo celular. Las placas se incuban 1 hora a 27 °C, agitando suavemente cada 10 minutos.
- 4) Mientras tanto, se prepara agarosa, Agarplaque™ de Pharmigen, al 2% (p/v) en agua. La mezcla se autoclava para esterilizarla y disolver la agarosa completamente.
- 5) La disolución de agarosa se mezcla con el medio Insect X-Press en relación 1:1 y todo ello se atempera a 37 °C.
- 6) Se retira el sobrenadante de las placas y se cubren con 2 ml de la agarosa al 1% (p/v), añadiéndola cuidadosamente por la pared de la placa. La agarosa solidifica en unos 15-20 min. De esta forma las células quedan inmovilizadas y se evita que la progenie viral se propague a través del medio, infectando a otras células. Una vez solidificada la agarosa, se cubren los pocillos con medio de cultivo y las placas se incuban a 27 °C durante 5 días.
- 7) Transcurrido dicho tiempo de incubación, se retira el medio y se añade 1 ml de una disolución del colorante rojo neutro diluido al 0.03% (p/v) en PBS, pH 7.4. Este colorante tiñe exclusivamente células vivas, de manera que las regiones ricas en virus se detectan como manchas blancas sobre fondo rojo. Las placas se incuban durante 4 h a 27 °C. Tras este tiempo, se retira el colorante y se incuban invertidas en oscuridad durante, aproximadamente, 24 h.
- 8) Una vez que las placas se han secado completamente, se pueden observar los halos de lisis, cada uno de los cuales corresponderá a un único clon viral.

- 9) Con una punta estéril se extrae la región de la agarosa donde se encuentra el halo de lisis, y por tanto, también el virus. El fragmento de agarosa es llevado a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se mezcla con 0.5 ml de medio Insect X-press.
- 10) Finalmente se deja que el virus difunda de la agarosa al medio durante 24 horas a 4 °C con agitación suave, tras lo cual los 0.5 ml de medio pueden ser utilizados para amplificar el *baculovirus* recombinante purificado.

En el caso de la determinación del título de un virus, se procede a contar los halos de lisis en el pocillo en que éstos se encontraron más claramente diferenciados. Cada grupo de células infectadas o halo de lisis se denomina placa. El número de unidades formadoras de placa (Pfu) por ml de inóculo es:

$$\text{Pfu/ml} = \frac{\text{Número de placas}}{\text{V(ml)} \times \text{factor de dilución}}$$

siendo V el volumen (ml) utilizado para infectar. La obtención de un título superior a 10^7 es suficiente para utilizar dicho inóculo para la producción de proteína recombinante.

Debido a que el sistema BaculoGold™ permite obtener más del 99% de *baculovirus* recombinantes de toda la población viral, generalmente no es necesario purificar los virus obtenidos tras la cotransfección. No obstante, si se observa una reducción en la producción de proteína recombinante tras múltiples pases del virus, es conveniente aislar una población clonal viral por purificación en placa.

4.3.1.3. Amplificación de *baculovirus* recombinantes

Después de la cotransfección o de la purificación de virus, los *baculovirus* recombinantes deben ser amplificados para obtener un elevado título de virus que permita la adecuada infección de las células de insecto y la expresión de proteína recombinante en dichas células. Con este fin, se siembran 2×10^6 células de insecto Tni por cada 25 cm² de placa de cultivo, y se incuban 2 h a 27 °C para permitir la adhesión de las células a las placas de cultivo. Las células deben estar al 70% de confluencia y deben ser infectadas con una multiplicidad de infección o MOI (cantidad de virus inoculado por célula del cultivo celular) no superior a 1. El empleo de un MOI mayor de 1 para la amplificación de un virus implica un aumento del número de virus con mutaciones extensivas en su genoma. Las células se incuban con 1 ml de medio conteniendo el virus por cada 25 cm² de placa de cultivo durante 5 días a 27 °C,

después de haber estado agitando suavemente la placa cada 10 minutos durante 1 hora. Una vez transcurrido este tiempo, se añade medio Insect X-press a las células, hasta completar 5 ml por cada 25 cm² de superficie. Transcurridos los 5 días de infección, la suspensión se centrifuga 15 min a 1500 rpm y el sobrenadante se utiliza para una segunda ronda de amplificación.

Suelen realizarse dos o tres rondas de amplificación para obtener un elevado título de partículas virales (2×10^8 pfu/ml), suficiente para una infección a gran escala, una vez determinadas las condiciones ideales de MOI y tiempo de infección, que permita la expresión de la proteína recombinante de interés.

4.4. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CON EXTENSIÓN DE HISTIDINAS

La purificación de proteínas con una extensión de seis histidinas se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad empleando la resina Ni-ácido nitrilotriacético-agarosa (Ni-NTA-agarosa). De esta forma se dispone de un método rápido de purificación en un solo paso [336].

La unión de la proteína a la resina se produce a través de los seis residuos de histidina presentes en el extremo amino o carboxilo terminal de la proteína. Se produce una interacción entre los anillos imidazólicos de los residuos de histidina y los iones Ni²⁺. El ácido nitrilotriacético es el que permanece unido a la resina. La capacidad de unión de la resina de Ni-NTA-agarosa es de 5 a 10 mg de proteína/ml. Las proteínas que contienen una extensión de seis histidinas se unen a la resina de Ni-NTA con una afinidad muy elevada ($K_d = 10^{-13}$ M a pH 8.0). Por ello, las proteínas contaminantes, que se unen inespecíficamente, pueden ser eliminadas fácilmente lavando la columna con disoluciones que contengan imidazol a concentraciones de 10 y 30 mM. Además, la unión de proteínas con extensiones de seis histidinas no requiere una estructura determinada, por lo que no se ve afectada por la presencia de agentes desnaturizantes como urea o cloruro de guanidinio, de detergentes no iónicos o de concentraciones elevadas de sal (0.1-1.0 M).

En líneas generales el proceso de purificación es el siguiente: la muestra a purificar se aplica en una columna de Ni-NTA-agarosa equilibrada en el tampón de carga a pH neutro o ligeramente básico, manteniendo un flujo de 1 ml/min. La columna se lava con el tampón de carga con imidazol 10 mM y, a continuación, con este mismo tampón con imidazol 30 mM, hasta que la absorción a 280 nm sea inferior a 0.05. La proteína unida específicamente a la columna se eluye con imidazol 200 mM, recogiendo fracciones de 1 ml.

4.4.1. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EXPRESADAS EN *TRICHOPLUSIA NI*

Con objeto de purificar las proteínas recombinantes utilizando el sistema de expresión basado en *baculovirus*, aproximadamente 150×10^6 células (280 ml de medio de cultivo) son infectadas por el virus recombinante. Tras incubar las células con el virus durante 5 días a 27 °C, el medio de cultivo se recoge y centrifuga durante 15 min a 1500 rpm en rotor GS3. A continuación, los 280 ml son dializados frente a tampón Tris 20 mM pH 8.0, NaCl 50 mM. Finalmente, el volumen total se carga en una columna con 2 ml de Ni-NTA agarosa, previamente equilibrada en el mismo tampón de diálisis y se procede tal y como se indica en el apartado de purificación de proteínas con una extensión de histidinas.

4.5. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Las electroforesis de proteínas se llevaron a cabo en un sistema discontinuo siguiendo el procedimiento descrito por Laemmli en 1970 [337]. La polimerización de los geles y el desarrollo de la electroforesis se llevaron a cabo en un sistema mini-Protean III o IV de BioRad. Se usaron geles de 0.75 o 1 mm de espesor, 7 cm de alto y 9 cm de ancho, empleándose sistemas de 10 o 15 pocillos, según el ensayo concreto a realizar.

El gel separador se preparó con un 15% de acrilamida (excepto cuando se indica otro porcentaje) y bisacrilamida al 0.5% en Tris 0.38 M, pH 8.8 y SDS 0.1% (p/v). El gel concentrante, se preparó al 4% de acrilamida en tampón Tris 0.12 M, pH 6.8 con SDS al 0.1%.

Para la polimerización de los geles se añaden disoluciones de persulfato amónico al 0.02% (p/v) como agente catalizador y N,N,N',N' tetrametiletilendiamina (TEMED) al 0.075% como propagador de la reacción. Las muestras se disolvieron en tampón de aplicación de electroforesis, que contiene SDS 1% (p/v), glicerol 10% (v/v), Tris 50 mM pH 7.6, EDTA 2 mM, β - mercaptoetanol 5% (v/v) y azul de bromofenol 0.02% (p/v) como indicador de la migración, y se calentaron a 95 °C durante 10 min. Las electroforesis se desarrollaron a temperatura ambiente en tampón Tris 25 mM pH 8.3, glicocola 0.192 M con SDS al 0.1% (p/v) y a 25 mA por gel durante 45 minutos. Finalizada la electroforesis, las proteínas se detectaron mediante tinción con azul de Coomassie R-250 (Coomassie Brilliant Blue R-250 0.3% (p/v), metanol 45% (v/v) y ácido acético 10% (v/v)). El exceso de colorante se eliminó mediante una disolución de ácido acético al 7.5% (v/v) y metanol al 20% (v/v).

La cuantificación de la intensidad de las bandas se realizó utilizando el software Quantity One (Bio-Rad).

4.6. INMUNODETECCIÓN

El procedimiento de transferencia de gel a membrana de nitrocelulosa es el siguiente:

- 1) Sobre la placa que corresponde al polo positivo de un electrotransferidor Multiphor (LKB) se colocan tres capas de papel de filtro Whatman, seguidas de una membrana de nitrocelulosa (Amersham). Por encima de ésta se coloca el gel de poliacrilamida que contiene las proteínas que se desea transferir. Finalmente, se colocan sobre el gel otras tres capas de papel de filtro Whatman. Tanto los papeles de filtro como la membrana de nitrocelulosa y el gel de poliacrilamida son previamente empapados en el tampón de transferencia (Tris 48 mM, glicocola 39 mM, SDS 0.0375%, metanol 20%, pH 9.0).
- 2) Se coloca sobre ello la placa correspondiente al polo negativo y se ajustan los parámetros de amperaje y tiempo. Las proteínas son transferidas durante 1 h a 0.9 mA/cm^2 .

4.6.1. DETECCIÓN DE LA EXTENSIÓN DE HISTIDINAS

- 1) Terminada la transferencia, la membrana es incubada durante 30 min en PBS con leche en polvo al 5%, con agitación y a temperatura ambiente.
- 2) A continuación se lleva a cabo la incubación con el anticuerpo monoclonal anti-6 His (Sigma) conjugado con la peroxidasa de rábano (HRP) a una dilución 1:3000 en PBS durante 16 h a 4°C o alternativamente a dilución 1:1000 durante 2 h a temperatura ambiente.
- 3) Tras tres lavados de 10 min con PBS-Tween 20 al 0.1% (v/v), la membrana se revela usando para ello el reactivo ECL (del inglés "Enhanced Chemiluminescence") (Amersham Pharmacia Biotech), tal y como indica el fabricante, en un lector LAS3000 mini (Fujifilm).

4.6.2. DETECCIÓN CON ANTICUERPOS ANTI-E2 Y ANTI-E1

En este caso, tras la incubación durante 30 min en PBS con leche en polvo al 5%, la membrana se incuba durante 16 horas a 4°C con una mezcla de anticuerpos anti-E2 de ratón ALP98 ($1 \mu\text{g/ml}$) y AP33 (1:1000) o con un anticuerpo monoclonal anti-E1, A4 (1:1000), todos ellos cedidos amablemente por el Dr. Jean Dubuisson del Instituto Pasteur de Lille, Francia. Posteriormente, tras los correspondientes lavados, la membrana se incuba durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo

secundario de cabra anti-IgG de ratón (1:3000) conjugado con HRP. El revelado se realiza mediante el método ECL.

4.7. ENZIMOINMUNOENSAYO (ELISA)

4.7.1. ELISA CON SUEROS DE PACIENTES

Todos los ensayos se llevaron a cabo en placas Nunc F96 Maxisorp de 96 pocillos, fondo plano y alta capacidad de unión, realizándose cada uno de ellos por duplicado. El protocolo seguido se describe a continuación:

- 1) Los correspondientes pocillos de la placa se tapizan con 0.1 µg de proteína recombinante durante 16 h a 4 °C.
- 2) Cada pocillo es lavado 4 veces con PBS/Tween 20 al 0.5% (v/v).
- 3) Se tapizan los pocillos con PBS/Tween 20 al 0.1% (v/v)/leche en polvo al 3% (p/v) durante 1 h a 37 °C.
- 4) Los sueros ensayados se diluyen entre 100 y 500 veces en la disolución anterior y se incuban durante 2 h a 37 °C.
- 5) Se realizan cuatro lavados con PBS /Tween 20 al 0.5% (v/v).
- 6) Se añade el anticuerpo anti-IgG humana conjugado con HRP (1:10 000) (Sigma) en PBS/Tween 20 al 0.05% (v/v)/leche en polvo 1.5% (p/v) y se incuba durante 1 h a 37 °C.
- 7) Se realizan cuatro lavados con PBS/Tween 20 al 0.5% (v/v).
- 8) Finalmente se realiza el revelado utilizando 0.63 mg OPD (o-fenilendiamina, Merck) por ml y 1.6 µl de H₂O₂ al 30% por ml disueltos en tampón citrato 0.1 M, pH 5.0, metanol 4% (v/v). La reacción se detiene con H₂SO₄ 3 N.
- 9) Se mide la absorbancia a 492 nm.

Los sueros de pacientes infectados por el HCV fueron suministrados por el Dr. Fernando Vivanco de la Fundación Jiménez Díaz.

4.7.2. ELISA CON H53

Este ensayo se realiza siguiendo el protocolo indicado en el apartado anterior, con las salvedades de que se tapizan los pocillos con 10 µg/ml de proteína recombinante, el anticuerpo primario empleado es H53 (anticuerpo monoclonal conformacional proporcionado amablemente por el Dr. Jean Dubuisson del Instituto Pasteur de Lille, Francia), a una dilución 1:300, y como anticuerpo secundario se ha empleado un anticuerpo de cabra anti IgG de ratón (Sigma) a una dilución 1:3000.

4.8. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

4.8.1. ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS

El análisis de aminoácidos se lleva a cabo en un analizador automático Biochrom 30. La hidrólisis de la proteína (20 µg) se realiza a vacío a 110 °C durante 24h con 0.1 ml de HCl tridestilado azeótropo 5.9 N, conteniendo fenol al 0.1% (p/v). Finalizado el proceso, las muestras se secan en un desecador a vacío y se lavan añadiendo 2 veces un volumen de 0.1 ml de agua destilada, secando tras cada adición.

A continuación, las muestras se disuelven en 100 µl de tampón de aplicación, que contiene 19.6 g de citrato sódico, 5 ml de tiodiglicol, 10 ml de HCl concentrado y 1 ml de ácido benzoico, en un volumen final de 1 L, a pH 2.0. La muestra se pasa a un tubo cónico de teflón, de 4 cm de longitud y 0.3 cm de diámetro, y se centrifuga 5 min a 10 000 rpm, analizándose 10-30 µl de cada muestra.

El número de nanomoles de cada aminoácido se calcula a partir del área del pico correspondiente, comparando con los valores obtenidos para una mezcla estándar de aminoácidos. Para calcular las posibles pérdidas en el sistema de inyección se utiliza norleucina como estándar interno. Los análisis se procesan con el programa Biosys de Biochrom 30.

4.8.2. ESPECTROS DE ABSORCIÓN

Para determinar la concentración de las diferentes preparaciones de proteína se recurrió con frecuencia a los espectros de absorción en el UV-visible. Para ello, es necesario determinar el coeficiente de extinción molar, cuantificando la cantidad de proteína de disoluciones de proteína de absorción conocida mediante análisis de aminoácidos. Los espectros de absorción, realizados entre las longitudes de onda de 250 y 350 nm, se obtienen en un espectrofotómetro Beckman DU-640 empleando una cubeta de cuarzo de 0.1 ó de 1 cm de paso óptico, dependiendo de la concentración de proteína.

4.9 DETERMINACIÓN TEÓRICA DE PARÁMETROS MOLECULARES

El cálculo teórico de la masa molecular se lleva a cabo a partir de su estructura primaria empleando el programa ProtParam disponible en el servidor Expasy (<http://www.expasy.org>).

La predicción de estructura secundaria de las diferentes proteínas recombinantes, a partir de su secuencia de aminoácidos, se llevó a cabo mediante la aplicación de métodos estadísticos descritos por Garnier y *col.* [338].

4.10 ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR

Las medidas de dicroísmo circular (DC) se realizan en un dicrógrafo JASCO-715, termostatzado con un baño de agua circulante Neslab RT-111 y equipado con un arco de Xenón de 150 W. Los valores de elipticidad molar por residuo ($[\Theta]_{MRW}$), expresada en $\text{grado}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$, se calculan teniendo en cuenta el valor de la masa molecular promedio por residuo de aminoácido de cada proteína.

El espectro de DC en el UV lejano se registra a partir de una longitud de onda de 250 nm y hasta los 190 nm, empleando una cubeta de 0.1 cm de paso óptico y una concentración de proteína de 0.1-0.15 mg/ml. El tampón empleado fue Tris 20 mM, NaCl 50 mM, pH 8.0.

4.10.1. CÁLCULO DE ESTRUCTURA SECUNDARIA

La estructura secundaria de las diferentes proteínas se ha determinado a partir de los espectros de dicroísmo circular mediante el método *Convex Constraint Analysis* (CCA) [339]. Este método permite deducir la contribución quiral de los elementos de estructura secundaria más comunes, directamente de los espectros de DC experimentales y sin necesidad de hacer uso de los datos de rayos X de proteínas conocidas. El algoritmo descompone el espectro en sus componentes puras que resultan ser muy parecidas a los que se obtienen utilizando polipéptidos modelo.

4.11. ESPECTROS DE EMISIÓN DE FLUORESCENCIA INTRÍNSECA

Todos los estudios de fluorescencia se han realizado en un espectrofluorímetro SLM AMINCO 8000C (SLM Instruments), equipado con un arco de Xenón de 450 W y provisto de un sistema de termostatzación por baño de agua circulante.

Las medidas de emisión de fluorescencia de las diferentes proteínas se llevan a cabo empleando una rendija de 4 nm, tanto en excitación como en emisión, siendo la velocidad de barrido de 60 nm/min. Los espectros se registran excitando las muestras a 275 nm o a 295 nm y midiendo la emisión de fluorescencia desde 285 nm o 310 nm respectivamente, hasta 450 nm.

En general, a partir de estos espectros es posible conocer la contribución de las tirosinas a la emisión de fluorescencia, teniendo en cuenta que al espectro obtenido al excitar a 295 nm sólo contribuyen los residuos de triptófano. Sin embargo, es necesario normalizar este último espectro. El factor de normalización se calcula midiendo la relación que existe entre ambos espectros a partir de una longitud de onda de 380 nm, en la que no existe contribución de las tirosinas. El espectro obtenido excitando a 295 nm se multiplica por este factor y la contribución de las tirosinas se

obtiene como la diferencia entre el espectro de emisión con excitación a 275 nm y este espectro normalizado.

4.12. ESTUDIOS DE INTERACCIÓN CON LÍPIDOS

4.12.1. PREPARACIÓN DE VESÍCULAS DE FOSFOLÍPIDOS

En los ensayos llevados a cabo se utilizó fosfatidilglicerol de huevo (PG). El fosfolípido se disuelve en cloroformo:metanol (2:1) formándose la película lipídica mediante la evaporación del disolvente orgánico bajo corriente de nitrógeno y posterior secado a vacío. A continuación se hidrata la película durante 1 h en el tampón correspondiente. Esta hidratación se realiza en baño a 37 °C, con agitación vigorosa en vortex cada 10 min. A continuación, la suspensión se sonica en un sonicador de baño (Branson 1200, Branson, Conneticut, USA) y se somete a un mínimo de quince etapas de extrusión en el dispositivo LiposoFast™-Basic (Avestin), a través de filtros de policarbonato de 100 nm de tamaño de poro conocido (Avestin).

4.12.2. VALORACIÓN DE FÓSFORO

La concentración de fosfolípido de las diferentes muestras se ha determinado mediante la cuantificación del fósforo, siguiendo el método descrito por Barlett [340]. El reactivo de Fiske-Subbarow es una disolución de 6.25 mg de ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico y 5 g de bisulfito sódico en 25 ml de agua destilada. La reacción se basa en la reducción del molibdeno hexavalente del complejo fosfomolibdato amónico, obtenido por la reacción en medio ácido entre el fosfato inorgánico y el molibdato amónico, por el reactivo de Fiske-Subbarow para formar un complejo de color azul. A la muestra a valorar se le añaden 0.3 ml de ácido sulfúrico, dejando la disolución 2 h a 190-200 °C. Tras enfriar, se añaden 2-3 gotas de peróxido de hidrógeno. Se agita y se deja 2 h a 190-200 °C. Posteriormente, la muestra se diluye con 0.3 ml de agua destilada y se añaden 0.2 ml de molibdato amónico y 0.2 ml del reactivo de Fiske-Subbarow. Se agita y se deja a 80-90 °C hasta la aparición de color azul. Se mide la absorbancia a 830 nm y los valores obtenidos se interpolan en la recta de calibrado obtenida a partir de disoluciones de KH_2PO_4 , con cantidades comprendidas entre 50 y 1000 ng de fósforo.

4.12.3. ENSAYO DE AGREGACIÓN DE VESÍCULAS DE FOSFOLÍPIDOS

La agregación de vesículas de fosfolípidos se ha caracterizado siguiendo el incremento en densidad óptica a 360 nm inducido por la adición de las proteínas a una preparación de vesículas lipídicas. A esta preparación, a una concentración final de 0.14 mM, se le añaden diferentes concentraciones de proteína y se registra la DO_{360} a

lo largo del tiempo durante la incubación a 37 °C. Una vez que se alcanza el valor máximo, tras 15 min de incubación, se mide A_{360} con el fin de obtener las medidas puntuales. Todas las medidas se realizaron en un espectrofotómetro DU-640 (Beckman). En todos los casos se realizan controles de vesículas en ausencia de proteína. El tampón empleado fue *Medium Buffer* ajustado a diferentes valores de pH según se indique en cada caso.

4.12.4. ENSAYO DE MEZCLA DE LÍPIDOS

Para seguir la adhesión y fusión de membranas inducidas por la proteína se recurre al ensayo clásico de transferencia de energía entre un par dador-aceptor, incorporados en una matriz lipídica, que se encuentren a la distancia adecuada [341]. En este ensayo es posible cuantificar la transferencia de energía por resonancia entre el dador N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il) fosfatidiletanolamina (NBD-PE) y el aceptor N-(lisamina) rodamina B sulfonil fosfatidiletanolamina (Rh-PE), incorporados en la bicapa del liposoma.

Se preparan dos tipos diferentes de vesículas, marcadas que contienen un 1% (p/p) de NBD-PE y un 0.8% (p/p) de Rh-PE, y vesículas sin marcar. Todas las suspensiones de vesículas se preparan a una concentración final de lípido de 1 mg/ml en *Medium Buffer* al valor deseado de pH. A continuación, se mezclan las vesículas marcadas y sin marcar en una proporción 1:9, manteniendo una concentración final de lípido de 1 mg/ml. Esta preparación de vesículas se diluye, a continuación, hasta una concentración de 0.1 mg/ml de lípido a la cual se realizan los ensayos, se añaden diferentes concentraciones de proteína y se incuba a 37 °C durante 1 h. La longitud de onda de excitación empleada es de 450 nm. La fusión de las vesículas marcadas y sin marcar se pone de manifiesto por el aumento de la emisión del NBD-PE a 530 nm y la disminución de la emisión de la Rh-PE a 590 nm. En todos los casos se mantienen rendijas de excitación y de emisión constantes a 4 nm. El polarizador de emisión se mantiene a 90° y el de excitación a 0°. La eficiencia de la transferencia de energía por resonancia (%RET) se calcula como la relación entre las intensidades de fluorescencia a 590 y 530 nm, utilizando la curva de calibrado apropiada y obtenida a partir de vesículas marcadas que contienen un 1% de NBD-PE y una concentración de Rh-PE variable entre 0 y 1%, teniendo en cuenta que:

$$\%RET = [1 - (F/F_0)] \times 100$$

siendo:

F: intensidad de fluorescencia a 530 nm de vesículas con un 1% de NBD-PE y un 0-1% de Rh-PE.

F₀: intensidad de fluorescencia a 530 nm de vesículas marcadas que contienen un 1% de NBD-PE y un 0% (p/p) de Rh-PE.

En todos los casos, tras la adición de la cantidad correspondiente de proteína, se mide la emisión de fluorescencia a 590 nm en función del tiempo. Una vez que se estabiliza la medida, se registra el espectro de emisión de fluorescencia de la mezcla.

4.12.5. ENSAYO DE LIBERACIÓN DE CONTENIDOS ACUOSOS

El ensayo de liberación del contenido acuoso de los liposomas se lleva a cabo mediante la coencapsulación del fluoróforo ácido 8-aminonaftaleno 1,3,6-trisulfónico (ANTS), a una concentración 12.5 mM, y el apagador colisional bromuro de N,N'-p-xileno-bis-piridinio (DPX), a una concentración 45 mM, en *Medium buffer* al pH que se indique [342]. Las vesículas se hidratan en dichos tampones al pH deseado y, tras un proceso de sonicación, se someten a 5 ciclos de congelación en nitrógeno líquido/descongelación a 37 °C. A continuación se someten a extrusión como se ha indicado anteriormente. El material que no queda encapsulado se separa de las vesículas mediante una cromatografía de penetrabilidad en una columna de Sephadex G-75 (Pharmacia) de 10 x 2 cm. Como tampón de incubación se usa *Medium Buffer* al pH que se indique. Los ensayos se realizan a una concentración de fosfolípido de 0.1 mg/ml (0.14 mM), añadiendo diferentes concentraciones de proteína e incubando a 37 °C durante 1 h. El valor de 100% de liberación se obtiene mediante adición de Triton X-100 al 0.5%, siendo el valor de 0% el obtenido al añadir tampón. Se emplea una longitud de onda de excitación de 385 nm y de emisión de 520 nm. Se sigue la cinética del proceso mediante la medida de la intensidad de fluorescencia a 520 nm en función del tiempo, siempre a una temperatura de 37 °C y con agitación. El parámetro %F_{máx} se obtiene de la siguiente ecuación:

$$\%F_{\text{máx}} = \frac{IF_{\text{prot}} - IF_0}{IF_{\text{Triton}} - IF_0}$$

siendo:

IF_{prot} la intensidad de fluorescencia, una vez estabilizada, tras la adición de la proteína.

IF₀ la intensidad de fluorescencia inicial, antes de añadir la proteína.

IF_{Triton} la intensidad de fluorescencia, una vez estabilizada, tras la adición de Triton X-100.

Todas las intensidades de fluorescencia se corrigen teniendo en cuenta la dilución que se produce cuando se añade el Triton X-100.

4.13. ESTUDIO DE LA INTEGRACIÓN EN MEMBRANA POR EL SISTEMA DE TRADUCCIÓN-GLICOSILACIÓN *IN VITRO*

El estudio de la capacidad de integración de los diferentes segmentos transmembrana se lleva a cabo usando reticulocitos como herramienta de transcripción y traducción, y microsomas como sistema de membranas de anclaje. Dichos microsomas (μ S) contienen además la glicosiltransferasa. Los diferentes patrones de glicosilación permiten conocer la disposición de dichos segmentos en la membrana pudiéndose saber si un dominio hidrofóbico se integra o se asocia (proteína monoglicosilada) o queda fuera de una bicapa lipídica (proteína doblemente glicosilada).

En primer lugar, se clonan los dominios transmembrana de E1 y E2 en el plásmido pGEM1-Lep entre los sitios *SpeI* y *KpnI* generando los plásmidos pGEM1-Lep-TMD. Dichos dominios quedan flanqueados por dos dianas de glicosilación las cuales se glicosilarán sólo en el caso de que queden hacia la cara externa de la bicapa.

Una vez obtenidos los diferentes plásmidos, el protocolo seguido para analizar el proceso de integración de los dominios TMD en la membrana es el siguiente:

- 1) Se mezclan en un tubo Eppendorf 75 ng de plásmido pGEM1-Lep-TMD con la secuencia de estudio clonada, 0.25 μ l de microsomas, 5 μ l de TNT Quick Master Mix (contiene material transcripcional y traduccional) y 0.5 μ l de metionina marcada radiactivamente (Met-[S^{35}]) (Perkin Elmer) para poder detectar de ese modo la proteína sintetizada.
- 2) Se incuba la mezcla durante 1 hora a 37 °C.
- 3) La reacción se para incubando los tubos en hielo unos minutos.
- 4) Se añaden 40 μ l de tampón de carga de electroforesis a la mezcla total de la reacción.
- 5) Se lleva a cabo una electroforesis PAGE-SDS con 20 μ l de la mezcla obtenida del paso anterior.
- 6) El gel se fija en líquido de desteñido durante 15 minutos.
- 7) Se seca el gel sobre un papel Whatman a vacío 1 hora a 80 °C.
- 8) El papel se expone tiempos variables a placas impresionables para obtener autorradiografías debido a la metionina marcada.
- 9) Las bandas se pueden cuantificar por densitometrado usando el programa Multi Gauge (Fujifilm).

4.13.1. ENSAYO DE PROTEINASA K

Este ensayo adicional es necesario para determinar si las bandas correspondientes a proteína monoglicosilada observadas son debidas al proceso de integración o a la posible asociación de la región de estudio a la cara externa de la membrana.

Tras el paso 3 del procedimiento general descrito en el apartado anterior:

- i. Se añade proteinasa K a una concentración de 0.2-0.3 mg/ml a la mezcla de reacción y se incuba durante 15 minutos en hielo.
- ii. Se para la reacción con 180 µl de PMSF 1 mM.
- iii. Las membranas se concentran por ultracentrifugación 15 min a 4 °C a 50 000 rmp sobre un cojín de sacarosa 0.5 M en buffer A (KOAc 4 M, hepes 1 M y MgCl₂ 1 M).
- iv. El sedimento obtenido se resuspende en 40 µl de tampón de carga de electroforesis.

A partir de este punto se continúa con el paso 5 del protocolo anterior.

4.14. DETERMINACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE LOS SEGMENTOS TRANSMEMBRANA: RECONSTRUCCIÓN DE LA PROTEÍNA VENUS (BiFC)

El sistema BiFC se basa en la complementación de dos partes de una proteína fluorescente ancladas de manera independiente a dos dominios transmembrana diferentes, de modo que sólo en el caso de que estos dos dominios se inserten en la membrana e interaccionen entre ellos se recuperará la fluorescencia [343]. En este caso, la proteína fluorescente utilizada es Venus, derivada de la GFP.

En primer lugar se clonan los dominios transmembrana de E1 y E2 indistintamente en los plásmidos pBiFC-VN155(I152L) y pBiFC-VC155 entre las dianas *EcoRI* y *XhoI* generando las construcciones pBiFC-VN/VC-TMD. Como control se utilizaron los plásmidos comerciales pBiFC-VN-Jun y pBiFC-VC-Fos, siendo Jun y Fos proteínas solubles con localización nuclear. Estos plásmidos fueron amablemente cedidos por el Dr. Ismael Mingarro de la Universidad de Valencia.

Una vez obtenidos los plásmidos recombinantes, el protocolo seguido es el siguiente:

- 1) Se siembran células HeLa en placas de 60 mm de diámetro con una densidad de 150 000 células por pocillo, permitiendo su crecimiento y adhesión celular

durante 16 h a 37 °C. Para este proceso se utiliza medio sin antibiótico para evitar el estrés metabólico de las células y favorecer, así, el proceso de transfección.

- 2) Una vez crecidas, se transfectan usando para ello Lipofectamine®2000 (Life Technologies) y 1.5 µg de cada uno de los plásmidos recombinantes pBiFC-VN-TMD¹ y pBiFC-VC-TMD² siguiendo el protocolo del fabricante. Se incuban durante 4 h a 37 °C.
- 3) Se retira el medio de transfección y se sustituye por medio nuevo con antibiótico para evitar riesgos de contaminación, incubando durante 30 horas nuevamente a 37 °C.
- 4) Se comprueba si ha habido complementación de las proteínas expresadas mediante visualización en un microscopio de fluorescencia y se procede a la preparación de las células para determinar la localización subcelular del dímero formado y el grado de interacción producida.

4.14.1. MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCENCIA

Con objeto de analizar la colocalización de ambos segmentos transmembrana en el retículo, se recurrió a la microscopía confocal de fluorescencia. Para ello:

- 1) Se siembran células HeLa sobre cubreobjetos de vidrio y se sigue el procedimiento de transfección descrito anteriormente.
- 2) Pasadas las 34 horas de incubación, y una vez comprobada la expresión de las proteínas, se añade al medio el marcador de retículo endoplásmico ER-Tracker™ Red (Molecular Probes), a varias concentraciones entre 100 nM y 1 µM, y se incuba a 37 °C durante tiempos variables (10-30 min) en total oscuridad.
- 3) Se retira el medio, se lavan los pocillos dos veces con PBS para eliminar el exceso de marcador y los restos de medio y se fijan las células con paraformaldehído (PFA) al 4% (p/v) durante dos minutos.
- 4) Se vuelven a lavar los pocillos con PBS.
- 5) Cuidadosamente se levantan los cristales y se depositan sobre una gota de medio de montaje, Fluoroshield DAPI (Sigma), en la superficie de un portaobjetos. Este medio contiene DAPI para marcar los núcleos de las células y la solución adherente que mantendrá el cristal unido indefinidamente a la superficie del portaobjetos.

La localización subcelular se analiza utilizando un microscopio confocal Leyca SP2 equipado con tres láseres, usando una longitud de onda de 515 nm para la fluorescencia de Venus, de 587 nm para el marcador de retículo y de 405 nm para el DAPI.

Las imágenes fueron tomadas en el Centro de Asistencia a la Investigación de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la Universidad Complutense de Madrid.

4.14.2. CITOMETRÍA DE FLUJO

El grado de interacción de ambos dominios transmembrana en células HeLa se determinó por citometría de flujo. Para ello se siguió el procedimiento de transfección descrito anteriormente y, una vez comprobada la presencia de interacción de las proteínas control expresadas (Jun y Fos), se procedió a la preparación de las células en suspensión según el siguiente protocolo:

- 1) Se retira el medio, se lavan las células dos veces con PBS para eliminar todos los posibles restos de rojo fenol que puedan interferir en la medida y se levantan usando para ello tripsina y dejando en torno a 10 minutos a 37 °C.
- 2) Una vez levantadas, la tripsina se diluye con PBS y posteriormente las células son centrifugadas a 1200 rpm durante 5 minutos.
- 3) Las células son resuspendidas a una concentración aproximada de 10^5 cel/ml en un volumen máximo de 200 μ l.

Las suspensiones se conservan a 4 °C hasta su medida en un citómetro de flujo FACScan (Coulter Electronics) cuantificando exclusivamente la señal correspondiente a la fluorescencia producida por la reconstrucción de la proteína Venus.

Las medidas de citometría de flujo fueron llevadas a cabo en el Centro de Asistencia a la Investigación de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la Universidad Complutense de Madrid.

4.15. PRODUCCIÓN DE PSEUDOPARTÍCULAS DE HCV (HCVpp)

Las pseudopartículas del HCV o HCVpp, están formadas por las glicoproteínas de la envoltura del HCV, E1 y E2 completas, ensambladas en partículas retrovirales que contienen un genoma derivado de un retrovirus asociado a un gen marcador, normalmente el gen de la luciferasa. Estas HCVpp permiten investigar todas las funciones mediadas por las glicoproteínas del HCV, además de servir como un modelo capaz de mimetizar la entrada y otras propiedades serológicas de los virus de la hepatitis C producidos en cultivo celular (HCVcc). El protocolo seguido para la obtención de estas HCVpp ha sido el siguiente:

- 1) Se siembran 1.0×10^6 células HEK 293T en una placa de 10 cm de diámetro a partir de un flask confluyente al 80% y se incuban 16 h a 37 °C.

- 2) Cuando las células alcanzan el 40% de confluencia, se procede a transfectarlas mediante precipitación por fosfato cálcico, según el siguiente protocolo:
En un tubo estéril se añaden los siguientes reactivos (por placa de 10 cm) en el orden indicado:
 - i. 1. pMLV-Luc : 8 µg
 - ii. 2.pMLV-Gag-Pol: 8 µg
 - iii. 3.pcDNA3.1-E1E2: 3 µg
 - iv. 4.CaCl₂ 2.5 M: 100 µl
 - v. 5.H₂O: hasta 500 µl
- 3) En otro tubo estéril, se añaden 500 µl de tampón HEBS 2x (NaCl 0.283 M, hepes 0.023 M pH 7.05 y Na₂HPO₄ 1.5 mM).
- 4) Se burbujea el tampón HEBS 2x a la vez que se añade la mezcla de DNA con CaCl₂ gota a gota. Se puede observar la formación de un precipitado blanco. Se incuba 20 min a temperatura ambiente.
- 5) La mezcla se distribuye sobre las células y se incuba a 37 °C durante 20 horas.
- 6) Se reemplaza el medio de las células por 5.5 ml de medio fresco con hepes 10 mM pH 7.0, y se incuba 24 h a 37 °C.
- 7) Se recoge el sobrenadante de las células conteniendo las partículas, y se filtran a través de un filtro de 0.45 µm. En este momento las partículas se pueden congelar a -80 °C, lo que supone una pérdida del 50% en su infectividad, o pueden ser purificadas tal y como se detalla en el apartado siguiente.
- 8) Las células HEK 293T transfectadas pueden ser lisadas con 1 ml de tampón de lisis (Tris 40 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, Igepal CA-630 1% y iodoacetamida 20 mM). Se agitan 10 min a temperatura ambiente, se recoge el lisado y se centrifuga 10 min a alta velocidad para clarificarlo.

4.15.1. PURIFICACIÓN DE HCVpp EN COJÍN DE SACAROSA

La purificación de las HCVpp se lleva a cabo por ultracentrifugación. La finalidad de este proceso es evaluar la composición de las partículas en un gel e infectar nuevos cultivos, entre otras aplicaciones. Para ello:

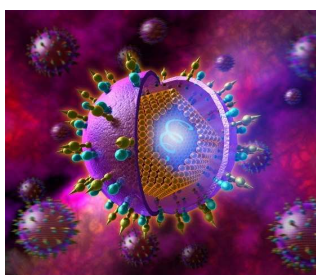
- 1) Se centrifuga el sobrenadante de las células HEK 293T transfectadas 10 min a 2000 rpm para clarificarlas.
- 2) Se filtra a través de un filtro de 45 µm.
- 3) El sobrenadante filtrado se añade cuidadosamente sobre 1.5 ml de sacarosa al 20% (p/v) en PBS.
- 4) Se centrifuga 127 min a 30 000 rpm y a 4 °C, en un rotor SW40.
- 5) El sobrenadante se descarta y se deja el tubo boca abajo unos minutos para permitir que se seque el sedimento.

- 6) Se resuspende el sedimento, que contiene las HCVpp purificadas, en PBS, DMEM o tampón de aplicación de electroforesis, según el uso que se les vaya a dar a estas partículas.

4.16. ENTRADA DE LAS HCVpp EN CÉLULAS Huh7

Una vez obtenidas las HCVpp, se procede a la infección de las células Huh7. El protocolo seguido se describe a continuación:

- 1) Se siembran células Huh7 en una placa de 96 (p96) o 24 (p24) pocillos, 4×10^3 o 2.5×10^4 células/pocillo respectivamente. Se incuban 16 h a 37 °C.
- 2) Tras retirar el medio de las células, se añade un volumen adecuado de HCVpp (30-50 µl/pocillo en p96 o 150 µl/pocillo en p24). Se incuban 3-4 h a 37 °C, agitando cada 30 min.
- 3) Se retira el inóculo y se añade medio fresco. Las células infectadas se incuban durante 3 días a 37 °C.
- 4) Pasado este tiempo, se analiza la actividad del gen de la luciferasa. Para ello se utiliza el kit de ensayo de la luciferasa Bright-Glo (Promega). Se retira el medio y se lisan las células en 100 µl de tampón de lisis Glo. Se añaden 100 µl de sustrato Brigh-Glo y se mide la actividad luciferasa en un luminómetro LB9507 (Thermo Fisher).



RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. IMPLICACIÓN DEL SUPUESTO PÉPTIDO FUSOGENICO 268-292 DE E1 EN LAS PROPIEDADES DEL COMPLEJO E1-E2

Como ya se ha comentado, muchos de los trabajos científicos presentados hasta el momento señalan a E2 como la proteína responsable de la fusión entre las membranas viral y celular en un proceso dependiente de pH ácido. Sin embargo, también son numerosos los estudios que revelan la importancia de una región de E1 como posible péptido fusogénico.

Con objeto de analizar el papel dicha región de E1 en la estructura y función del complejo de las proteínas de envoltura del HCV, se ha procedido a la delección de los residuos 268-292 en la proteína quimérica E2E1 producida previamente en el laboratorio [161]. Esta proteína contiene los ectodominios de las dos glicoproteínas de la envoltura del virus separados por la región de corte por la TEV proteasa y con una extensión de seis histidinas en el dominio N-terminal, lo que facilita su purificación mediante una cromatografía de afinidad en Ni-NTA (agarosa). La proteína se une a la resina Ni-NTA con una afinidad muy elevada ($K_d = 10^{-13}$ M a pH 8.0) (figura 26).

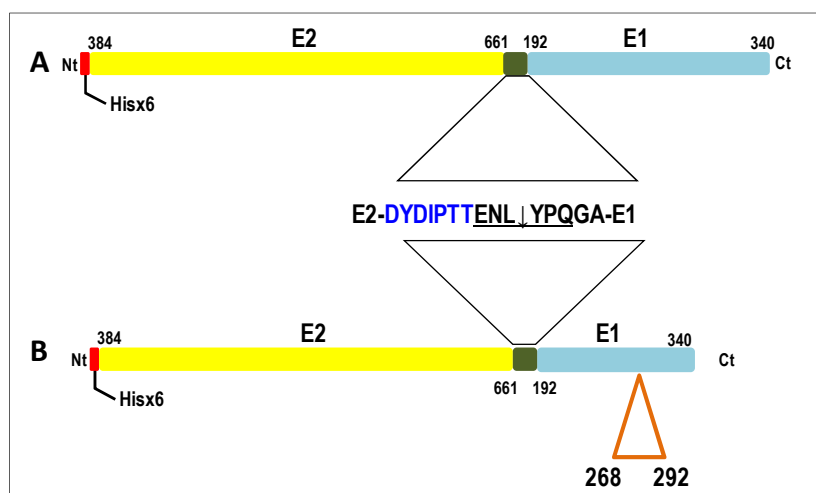


Figura 26. Representación esquemática de las construcciones E2E1 (A) y E2E1 Δ 268-292 (B).

En amarillo se representa el ectodominio de E2, en azul el ectodominio de E1, en verde la región de corte por la proteasa TEV y en rojo la extensión de seis histidinas en el dominio N-terminal. Los números indican la posición que ocupan en la poliproteína los aminoácidos de los extremos y en naranja se representa la región delecionada para el supuesto péptido fusogénico de E1.

5.1.1. OBTENCIÓN DEL PLÁSMIDO RECOMBINANTE pAcGP67A-E2E1_{Δ268-292}

La clonación se realizó en el vector pAcGP67A con el fin de expresar la proteína en el sistema de *baculovirus*. Para la obtención del plásmido recombinante pAcGP67A-E2E1_{Δ268-292} se ha seguido el método descrito por Pogulis [344] (figura 27). En primer lugar se amplificaron, mediante PCR y por separado, las regiones a ambos lados de la delección, utilizando como molde el plásmido pAcGP67A-E2E1, que previamente se había purificado en el laboratorio [161].

Se usaron los siguientes oligonucleótidos:

- Obtención del fragmento E1₂₉₃₋₃₄₀

E1Δ268F: 5'- CTT GTC GGG TTT TCT CCC AGG CGC C-3'
 L₂₆₅ V₂₆₆ G₂₆₇ F₂₉₃ S₂₉₄ P₂₉₅ R₂₉₆ R₂₉₇

GP67R: 5'- GGG TTT AAC ATT ACG GAT TTC -3'

Este oligo hibrida con los nucleótidos 4344-4364 del pAcGP67A, 78 bases por detrás del sitio de clonación *NotI*.

- Obtención del fragmento E2E1₁₉₂₋₂₆₇

E1Δ268R: 5'- GGG AGA AAA CCC GAC AAG CAG ATC G-3'
 P₂₉₅ S₂₉₄ F₂₉₃ G₂₆₇ V₂₆₆ L₂₆₅ L₂₆₄ D₂₆₃

GP67F: 5'- CAA GAT GGT AAG CGC TAT TG -3'

Este oligo hibrida con los nucleótidos 4185-4204 del plásmido pAcGP67-A, 64 bases por delante del sitio de clonación *BamHI*.

Los cebadores internos, E1Δ268F y E1Δ268R, tienen una región complementaria de 18 nucleótidos, que corresponden a los 9 nucleótidos finales de la región situada antes de la delección y los 9 nucleótidos de la región situada después de la delección. De estas dos PCR se obtienen los dos fragmentos que se fusionarán mediante una PCR de elongación, en ausencia de cebadores.

A continuación, se lleva a cabo una tercera PCR utilizando el producto de la segunda PCR como molde y los oligonucleótidos de los extremos (Gp67F y Gp67R) como cebadores lo cual permite la amplificación del fragmento de DNA con la región de interés suprimida.

Finalmente, la secuencia completa de E2E1 Δ 268-292 obtenida de esta PCR se inserta en el vector pAcGP67-A mediante digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Not*I y posterior ligación obteniéndose el plásmido recombinante pAcGP67A-E2E1 Δ 268-292.

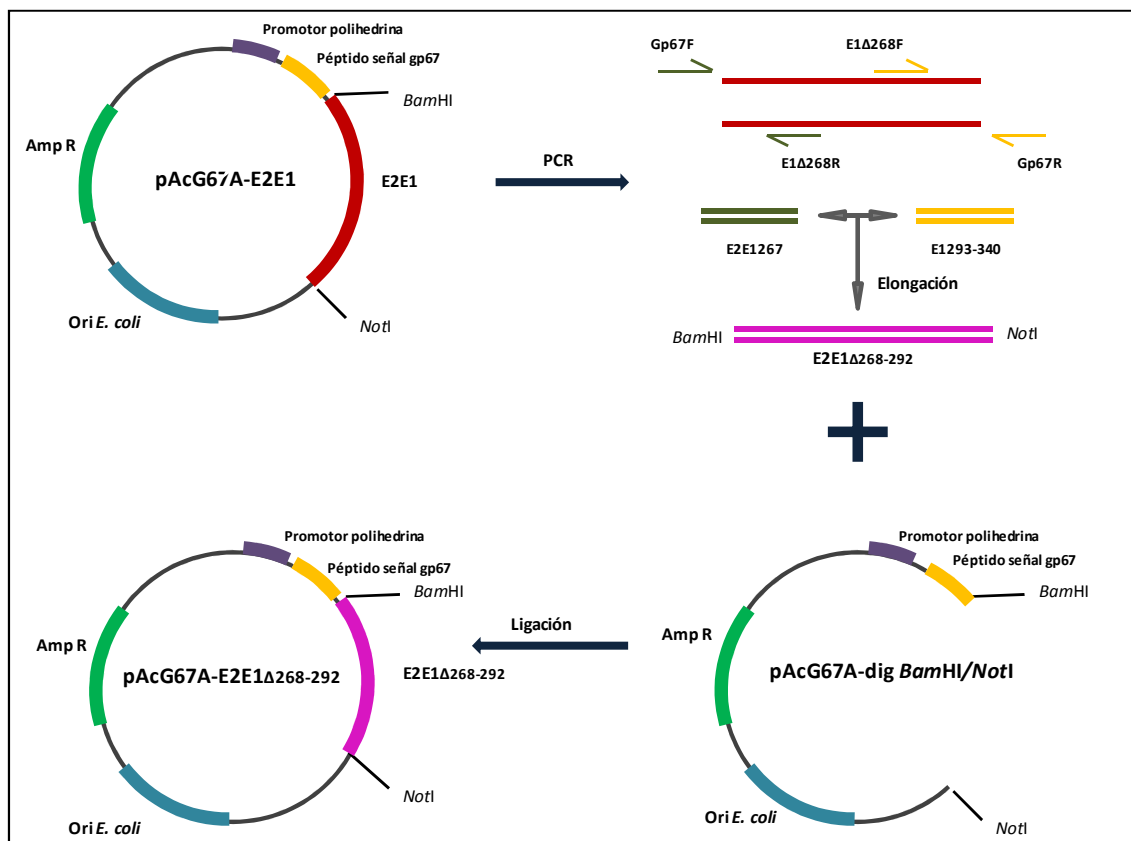


Figura 27. Esquema de obtención del plásmido pAcGP67A-E2E1 Δ 268-292. El fragmento correspondiente a la proteína quimérica E2E1 Δ 268-292 se obtuvo mediante una PCR con los cebadores indicados, consiguiendo un fragmento que sería digerido, al igual que el plásmido, con las enzimas de restricción *Bam*HI/*Not*I para ser posteriormente ligados y llevar a cabo la transformación de células de *E. coli*.

5.1.2. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN

Se procedió a realizar la cotransfección de células de insecto Sf9 con el genoma del *baculovirus* linealizado y el plásmido recombinante obtenido anteriormente, tal como se indica en el apartado 4.3.1.1 de Materiales y Métodos. Tras la purificación y la amplificación de los *baculovirus* recombinantes en células Tni, se llevó a cabo la purificación mediante una cromatografía de afinidad empleando una columna de Ni-NTA-agarosa, tal y como se indica en el apartado 4.4.1 de Materiales y Métodos. Durante el proceso de purificación la mayor parte de la proteína es retenida en la columna, y la elución de ésta con imidazol 200 mM permite obtener 10.7 mg de

proteína por litro de cultivo, cantidad que se encuentra en valores similares a los obtenidos para la purificación de la proteína E2E1 [161]. Tras su elución, la proteína fue dializada frente al tampón Tris 20 mM, NaCl 50 mM, pH 8.0.

Este proceso permite la purificación de la proteína con un alto grado de pureza, determinado mediante PAGE-SDS (figura 28). Las masa molecular experimental de la proteína resulta ser 64.4 kDa, unos 20 kDa mayor que la teórica calculada a partir de las secuencia de aminoácidos (47.9 kDa). Estas diferencias son debidas a que las proteínas secretadas por las células de insecto se encuentran altamente glicosiladas.

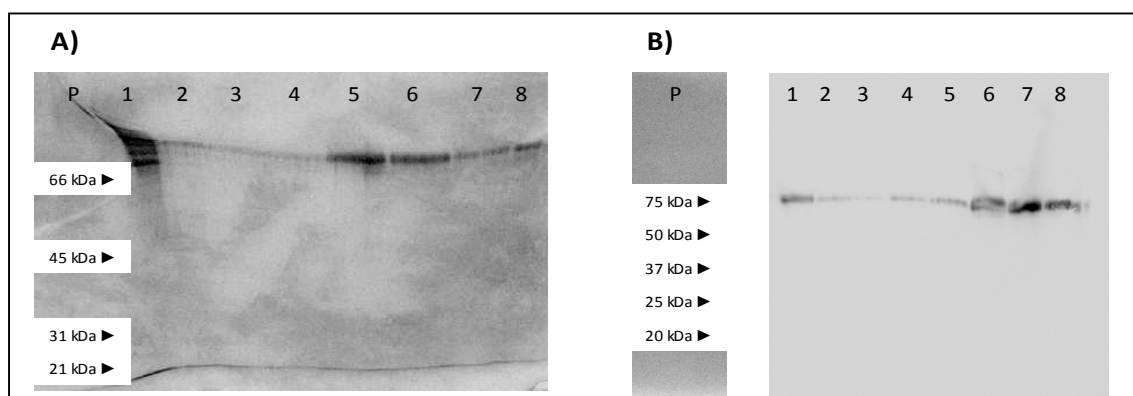


Figura 28. Purificación de E2E1_{Δ268-292} a partir del medio extracelular. A) Gel teñido con Coomassie; P: patrones; 1: lavado con imidazol 10 mM; 2-3: lavados con imidazol 30 mM; 4-8: fracciones 1-5 del eluido. B) Inmunodetección con un anticuerpo anti His. P: patrones; 1: medio inicial; 2: medio no retenido; 3: lavado con imidazol 10 mM; 4-5: lavados con imidazol 30 mM; 6-8: fracciones 2-4 del eluido.

El análisis de aminoácidos de la proteína purificada coincide con la composición teórica deducida a partir de la secuencia de nucleótidos de su DNA codificante. Para el cálculo de la concentración de la proteína se ha usado el coeficiente de extinción experimental calculado a partir del análisis de aminoácidos ($2.18 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), muy similar al teórico ($2.16 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Además de la quimera mutante E2E1_{Δ268-292}, se ha expresado y purificado la proteína silvestre E2E1 siguiendo los procedimientos previamente descritos [161]. La inmunodetección de ambas quimeras purificadas con los diferentes anticuerpos específicos para los ectodominios de E1 (A4) y E2 (AP33 +ALP98) y para la extensión de 6 histidinas en el extremo N-terminal revelan la capacidad de la proteína mutante de ser reconocida del mismo modo que lo hace la proteína silvestre E2E1 (figura 29).

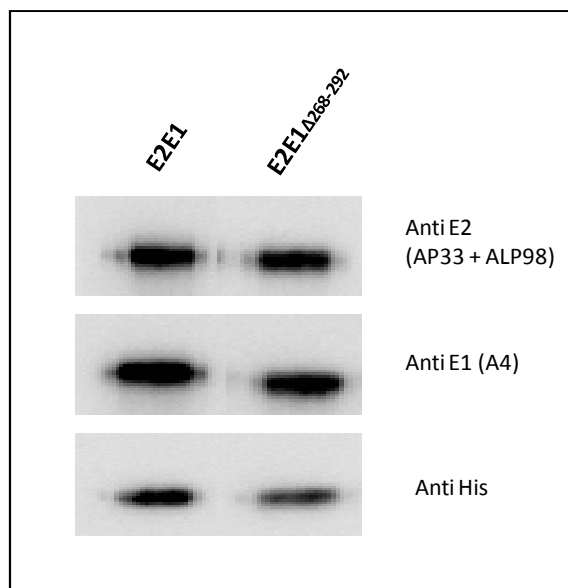


Figura 29. Inmunodetección con diferentes anticuerpos. La incubación se lleva a cabo con los anticuerpos anti E2 (AP33+ALP98), anti E1 (A4) y anti His utilizando 0.2 μg de las proteínas E2E1 y E2E1 $_{\Delta 268-292}$ purificadas mediante cromatografía de afinidad.

A continuación se describe la caracterización estructural y funcional de E2E1 $_{\Delta 268-292}$. Todos los estudios se han llevado a cabo conjuntamente con ambas quimeras con el fin de analizar los efectos de la delección del péptido 268-292 en las propiedades del complejo E2E1.

5.1.3. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

5.1.3.1. Caracterización espectroscópica

Se ha llevado a cabo la caracterización espectroscópica de E2E1 $_{\Delta 268-292}$ mediante dicroísmo circular en el ultravioleta lejano y espectroscopía de fluorescencia.

5.1.3.1.1. Espectro de dicroísmo circular

El espectro de dicroísmo circular de E2E1 $_{\Delta 268-292}$ en el ultravioleta lejano presentó un mínimo en torno a 208 nm, con una elipticidad molar promedio por residuo de, aproximadamente, $-7200 \text{ grado}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$, indicativo de la existencia de un porcentaje relativamente alto de estructura aperiódica (figura 30).

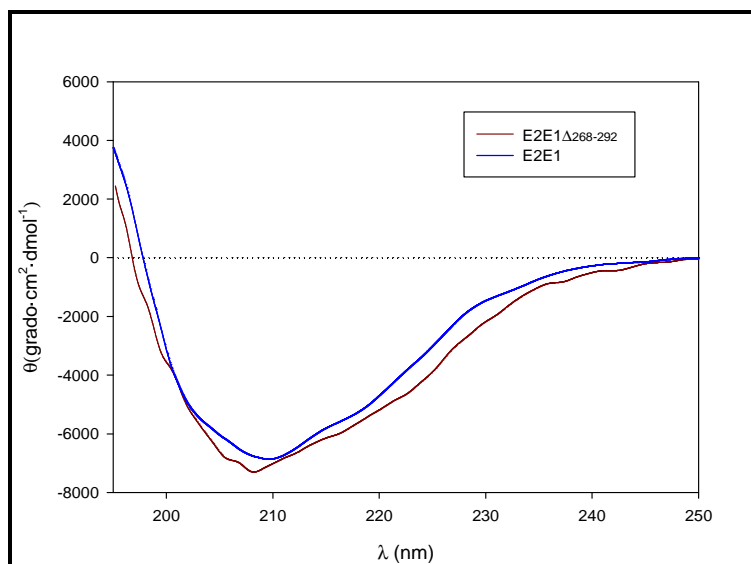


Figura 30. Espectro de dicroísmo circular de E2E1_{Δ268-292} y E2E1 en el UV lejano. Los espectros de dicroísmo se registraron en tampón Tris 20 mM, NaCl 50 mM, pH 8.0, en cubeta de 0.1 cm de paso óptico y con una concentración de proteína de 0.1 mg/ml.

A partir de estos datos experimentales y utilizando el método Convex Constraint Analysis (CCA) [339], se determinaron los porcentajes de las diferentes formas de estructura secundaria, que indican que se trata de una proteína con un alto contenido de estructura no ordenada (41%), siendo la estructura secundaria ordenada mayoritaria la de tipo β (45%) y minoritaria la de tipo hélice α (14%) (Tabla 3). Estos porcentajes son muy similares a los calculados cuando se analiza la secuencia de aminoácidos de E2E1_{Δ268-292} mediante el método de predicción de estructura secundaria GOR IV de Garnier [338] (figura 31).

% Estructura Secundaria	E2E1		E2E1 _{Δ268-292}	
	Exp.	Teórico	Exp.	Teórico
Hélice α	13%	8%	14%	8%
Estructura β	48%	32%	45%	31%
No ordenada	39%	60%	41%	61%

Tabla 3. Comparación de los porcentajes experimental y teórico de estructura secundaria de E2E1 y E2E1_{Δ268-292}. Los porcentajes experimentales de estructura secundaria fueron obtenidos aplicando el método CCA [339] al espectro de dicroísmo circular, mientras que los teóricos se obtuvieron mediante el método GOR IV para tres componentes [338].

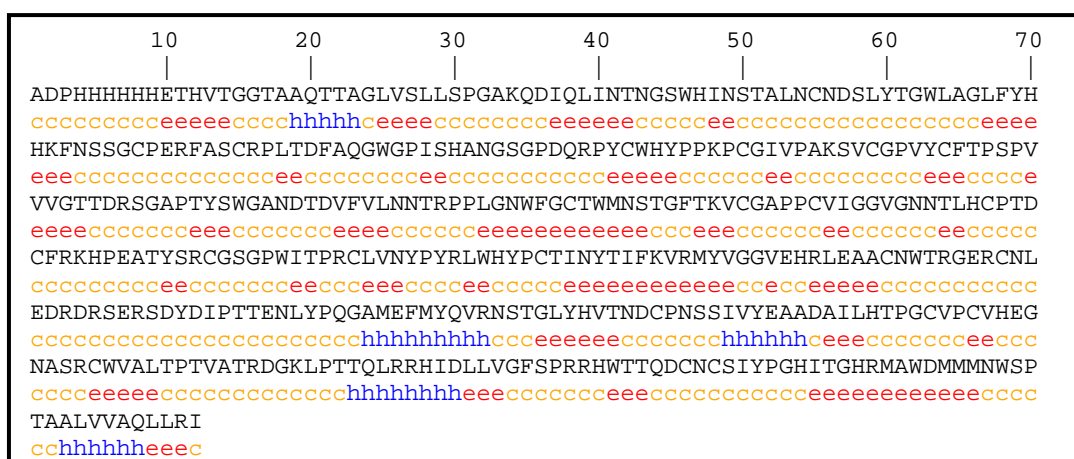


Figura 31. Predicción de estructura secundaria de E2E1_{Δ268-292}. Predicción llevada a cabo mediante el método GOR IV de Garnier para tres componentes siendo “c”, estructura aperiódica, “e”, estructura β y “h”, estructura α hélice.

En cualquier caso, con ambos métodos se observa que, tanto la proteína quimérica E2E1 como la deletada E2E1_{Δ268-292}, presentan un elevado porcentaje de estructura no ordenada, siendo la estructura ordenada mayoritaria la de tipo extendido. Por lo tanto, de acuerdo con los datos obtenidos, se puede afirmar que no se han producido variaciones importantes en la estructura secundaria de E2E1 al deletar la región fusogénica indicada.

5.1.3.1.2. Espectros de emisión de fluorescencia

Los espectros de emisión de fluorescencia se registraron a pH 8.0 y 25 °C, excitando tanto a 275 nm como a 295 nm con el fin de conocer la contribución de triptófanos y tirosinas, así como para determinar si la proteína recombinante posee características de estructura plegada.

El espectro de emisión de fluorescencia de la proteína E2E1_{Δ268-292} presentó un máximo en torno a los 333 nm al excitar tanto a 275 nm como a 295 nm (figura 32). Según se observa, la contribución de los residuos de tirosina es mínima, con lo que su fluorescencia debe estar apagada por residuos próximos o bien por transferencia de energía a los residuos de triptófano. Además, la posición del máximo (333 nm) es indicativa de que los triptófanos se encuentran en un entorno relativamente apolar, ya que el triptófano libre en disolución tiene un máximo de emisión en torno a 350 nm, mientras que cuando este residuo está en un entorno de alta hidrofobicidad el máximo de emisión de fluorescencia se encuentra centrado entre los 310-320 nm [345].

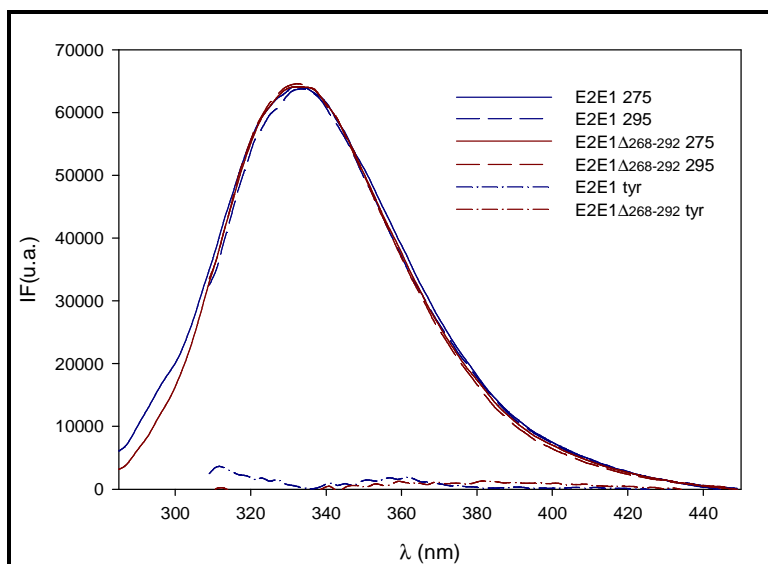


Figura 32. Espectro de fluorescencia de E2E1_{Δ268-292} y E2E1. Los espectros se registraron en tampón Tris 20 mM, NaCl 50 mM, pH 8.0 a una concentración de proteína de 50 μg/ml. La normalización de los espectros se realiza según lo indicado en el apartado 4.11.1 de Materiales y Métodos.

Los espectros obtenidos son prácticamente indistinguibles de los correspondientes a la proteína quimérica E2E1, indicando que ambas proteínas deben estar plegadas de manera muy similar siendo sus propiedades estructurales prácticamente idénticas.

5.1.3.2. Caracterización del estado de oligomerización

Con el objetivo de determinar el grado de oligomerización de E2E1_{Δ268-292} se realizó un gel de poliacrilamida en el que las muestras se prepararon tanto en presencia como en ausencia de β-mercaptoetanol.

El β-mercaptoetanol es un agente reductor que rompe las posibles interacciones mantenidas por puentes disulfuro entre los monómeros de la proteína. En su presencia sólo es posible observar la forma monomérica mientras que si prescindimos de este agente podremos observar los diferentes oligómeros formados por puentes disulfuro entre monómeros.

La diferencia de tamaños entre ambas proteínas es apreciable en la figura 33. La proteína E2E1 (pocillo 3) y el mutante E2E1_{Δ268-292} (pocillo 4), que contiene 25 residuos menos, muestran tamaños claramente diferenciados debido a la delección. Ambas proteínas presentan un tamaño en torno a un 26% mayor que su tamaño teórico debido a las glicosilaciones, siendo los tamaños calculados según su composición de aminoácidos de 50.5 kDa para E2E1 y de 47.9 kDa para el mutante

E2E1 $_{\Delta 268-292}$ y los reales obtenidos en el gel de 69.8 kDa y 64.4 kDa, respectivamente. Se observa la formación de dímeros, trímeros y de oligómeros de mayor orden que no entran en el entramado del gel (pocillos 1 y 2).

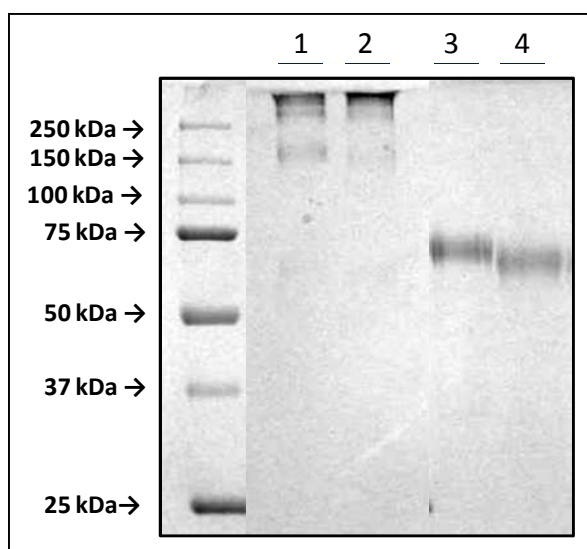


Figura 33. Estudios de oligomerización de E2E1 y E2E1 $_{\Delta 268-292}$. Gel con tinción Coomassie. Pocillos 1 y 2: E2E1 y E2E1 $_{\Delta 268-292}$ en ausencia de β -mercaptoetanol. Pocillos 3 y 4: E2E1 y E2E1 $_{\Delta 268-292}$ en presencia de β -mercaptoetanol. En todos los casos se aplican 2 μ g de proteína.

5.1.3.3. Caracterización antigénica

Con el objetivo de analizar el potencial antigénico de la proteína recombinante, se realizó un ensayo de ELISA donde se comprobó la capacidad de E2E1 $_{\Delta 268-292}$ en comparación con E2E1, de unirse a los anticuerpos presentes en un conjunto de sueros de pacientes infectados y no infectados por el virus de la hepatitis C (figura 34). Se utilizaron un total de 6 sueros positivos (1-6) y 2 sueros negativos (7-8). Ambas proteínas fueron reconocidas por los anticuerpos presentes en los sueros positivos mientras que no se apreció respuesta alguna en los sueros de pacientes no infectados por HCV. Por otro lado, también se testaron ambas proteínas frente al anticuerpo conformacional H53 obteniéndose un patrón muy similar (figura 34 insertada).

La respuesta generada por la proteína truncada es comparable o incluso mayor que la producida por la proteína completa E2E1, lo cual evidencia que la región deletada no afecta a los determinantes antigénicos reconocidos por los diferentes anticuerpos o incluso que favorece su exposición.

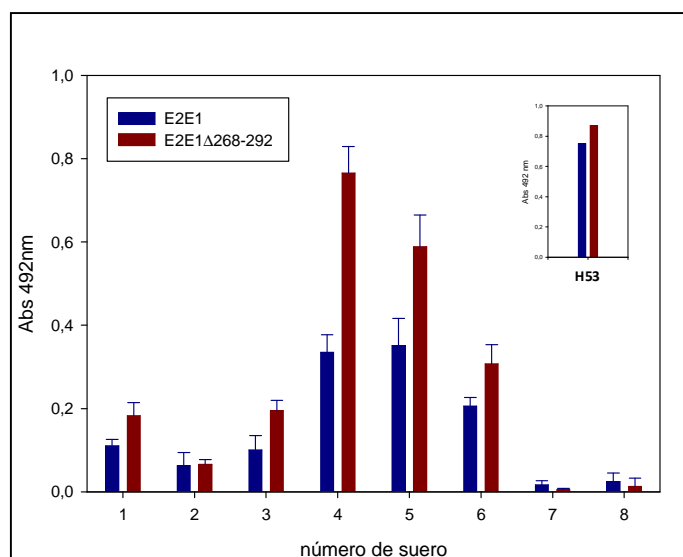


Figura 34. Caracterización antigénica de E2E1 y E2E1 Δ 268-292. Las placas de ELISA se tapizaron con 0.1 μ g por pocillo de proteína recombinante. Se ensayaron 6 sueros de pacientes infectados por el HCV (sueros 1-6) y 2 sueros de pacientes no infectados (7-8) como control negativo (dilución 1/500). En la gráfica insertada se muestra el reconocimiento por H53.

Por lo tanto, los datos obtenidos a lo largo de esta caracterización estructural revelan que la proteína generada al delecionar la región 268-292 de E1, descrita como posible péptido fusogénico, presenta las mismas propiedades estructurales y conformacionales que la quimera E2E1 usada como base para estos estudios.

5.1.4. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL: ESTUDIOS DE INTERACCIÓN LÍPIDO-PROTEÍNA

Con objeto de determinar la influencia del supuesto péptido fusogénico comprendido entre los residuos 268-292 de E1 en la capacidad de E2E1 de interactuar con lípidos, se llevaron a cabo estudios de desestabilización de vesículas fosfolípídicas.

Dichos estudios se han realizado empleando vesículas de fosfolípidos ácidos (PG), ya que se ha descrito que tanto la quimera con los ectodominios completos (E1E2) [286] como la proteína con los ectodominios permutados (E2E1) [346] interactúan con vesículas de fosfolípidos neutros (PC) de manera mucho más débil, siendo su capacidad para desestabilizar vesículas muy baja [346].

5.1.4.1. Ensayos de agregación

La capacidad de la proteína E2E1 Δ 268-292 de inducir agregación de vesículas de PG se determinó midiendo el incremento de la absorbancia a 360 nm producido como

consecuencia de la dispersión originada por un aumento en el tamaño de las vesículas lipídicas.

La proteína E2E1 $_{\Delta 268-292}$ induce la agregación de vesículas constituidas por PG a pH 5.0 de una manera dependiente de la concentración de proteína de igual modo que la proteína formada por los ectodominios completos E2E1 (figura 35).

Por otro lado, a pH 7.0, los niveles de agregación que induce E2E1 $_{\Delta 268-292}$ son menores en comparación a los observados a pH 5.0, aunque la agregación producida por el mutante de delección resulta superior a la inducida por E2E1 a pH neutro. En cualquier caso, estos resultados confirman el mecanismo propuesto de entrada del virus dependiente de pH ácido.

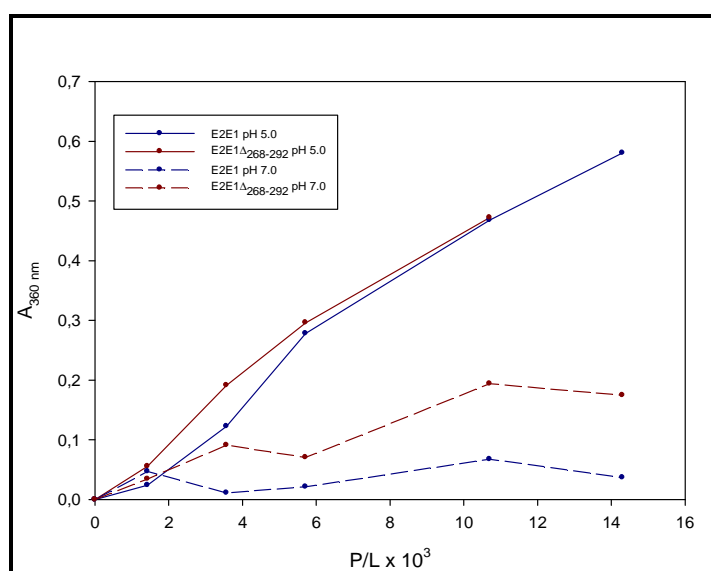


Figura 35. Agregación de vesículas de fosfolípidos inducida por E2E1 $_{\Delta 268-292}$ y E2E1. Las vesículas de PG se incubaron con la proteína recombinante, a diferentes relaciones proteína/lípido (P/L), en *Medium Buffer* a pH 7.0 y 5.0. Tras 1 hora de incubación a 37 °C, se midió la absorbancia a 360 nm. Los resultados mostrados son representativos de los obtenidos en tres experimentos diferentes.

5.1.4.2. Mezcla de lípidos

Con el fin de conocer si E2E1 $_{\Delta 268-292}$ puede inducir la fusión de vesículas constituidas por PG, se ha recurrido al ensayo clásico de dilución de sondas fluorescentes, midiendo la transferencia de energía (RET) entre un par dador/aceptor (NBD-PE/Rh-PE) incorporados en una matriz lipídica [341]. La fusión de una vesícula marcada con otra sin marcar hace que la densidad superficial de las sondas disminuya, aumentando la distancia entre ellas y disminuyendo, por tanto, la transferencia de energía. A medida que aumenta la concentración de proteína disminuye la

fluorescencia a 590 nm debida al aceptor (Rh), a la vez que aumenta la fluorescencia a 530 nm correspondiente al dador (NBD). El porcentaje de RET (%RET) se calcula teniendo en cuenta la relación F_{590}/F_{530} obtenida a cada concentración de proteína y la curva de calibrado apropiada.

Se comprobó que esta proteína recombinante induce mezcla de lípidos a pH ácido, siendo el efecto producido a pH 7.0 considerablemente menor (figura 36). Así, el %RET disminuye desde el 60%, en ausencia de proteína, hasta un 12% a pH 5.0 para una relación molar P/L de $20 \cdot 10^{-3}$. En cambio, a pH 7.0 el %RET sólo disminuye hasta un 41% y se mantiene casi constante desde una relación P/L de $7 \cdot 10^{-3}$. El efecto es muy similar al mostrado para E2E1 por lo que la eliminación del péptido descrito como fusogénico para E1 no altera la capacidad de la proteína quimérica E2E1 para producir mezcla de lípidos.

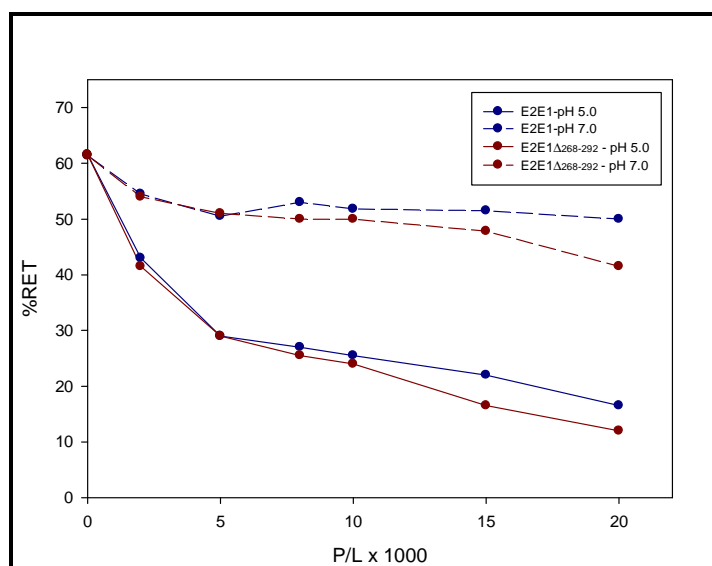


Figura 36. Mezcla de lípidos de vesículas de PG inducida por E2E1 y E2E1 Δ 268-292. Una mezcla 1:9 de vesículas marcadas y sin marcar fue incubada con la proteína recombinante, a diferentes valores de P/L, en tampón *Medium Buffer* pH 7.0 o 5.0 a una concentración de lípido de 0.1 mg/ml. Tras 1 hora de incubación a 37 °C, y utilizando las correspondientes curvas de calibrado, se calculó, el %RET a partir de la relación de intensidades de fluorescencia a 530 y 590 nm. Los datos mostrados son representativos de al menos dos ensayos realizados.

5.1.4.3. Liberación de contenidos acuosos

El aumento de la permeabilidad de las vesículas inducido por la adición de la proteína E2E1 y su mutante de delección se ha estudiado siguiendo el ensayo descrito por Ellens [342]. La interacción de la proteína con vesículas produce desde la aparición de poros hasta la pérdida de la integridad física de las mismas. Si estas vesículas llevan

co-encapsulados un fluoróforo (ANTS) y su apagador colisional (DPX), se producirá una dilución del fluoróforo y del apagador en el medio, aumentando, por tanto, la intensidad de fluorescencia.

E2E1 y E2E1 $_{\Delta 268-292}$ son capaces de inducir la liberación de contenidos acuosos de vesículas de modo dependiente de la concentración (figura 37). A una relación proteína/lípido de $0.25 \cdot 10^{-3}$, se alcanza un 80% de F_{\max} para E2E1 y un 100% de liberación es observado a una relación de $4 \cdot 10^{-3}$ ($0,33 \mu\text{M}$). En el caso de E2E1 $_{\Delta 268-292}$, el nivel de F_{\max} del 80% es alcanzado a una relación P/L de $2,5 \cdot 10^{-3}$, un valor 10 veces menor que el de la quimera con los ectodominios completos y sólo a una relación de $10 \cdot 10^{-3}$ ($1,4 \mu\text{M}$) se alcanza el 100%. En ambos casos, la concentración es mucho menor que la necesitada para producir agregación o mezcla de lípidos.

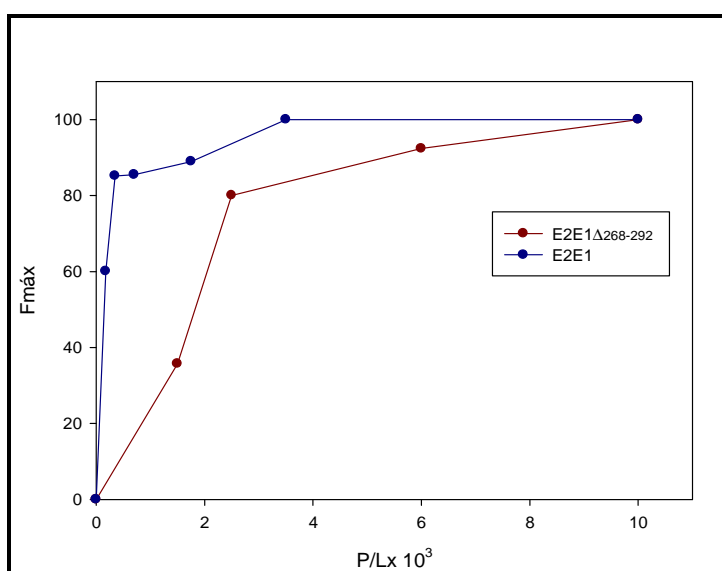


Figura 37. Liberación del contenido acuoso inducida por E2E1 y E2E1 $_{\Delta 268-292}$. Se añadieron concentraciones crecientes de ambas proteínas a vesículas marcadas con ANTS y DPH en *Medium Buffer* a pH 5.0 o 7.0. F_{\max} se obtuvo al añadir Triton X-100 al 0.5%. Las medidas se llevaron a cabo a 37 °C a una concentración de fosfolípidos final de 0.14 mM. Los resultados son representativos de dos experimentos diferentes.

Estos datos revelan, a diferencia de los estudios anteriores, la implicación de la región 268-292 de E1 en esta etapa del proceso fusogénico ya que, en comparación con la proteína quimérica E2E1, se requieren concentraciones mucho más elevadas del mutante de delección para producir liberación de contenidos acuosos y, además, el proceso parece ser mucho menos cooperativo.

5.1.5. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL: GENERACIÓN DE HCVpp

Una vez determinado el papel del péptido fusogénico en la desestabilización de bicapas de fosfolípidos, se ha procedido a estudiar el efecto de la delección de este péptido utilizando un sistema más complejo, las pseudopartículas de HCV (HCVpp). Estas partículas mimetizan la superficie exterior del virus y permiten el estudio de las primeras etapas del ciclo infectivo [69, 200]. Mediante este sistema será posible observar la implicación global de la región 268-292 en el proceso de entrada en células de hepatoma humano Huh7.

5.1.6.1. Obtención del plásmido recombinante pCDNAC₁₃₂E1_{Δ268-292}E2

El sistema de HCVpp requiere el uso del vector pCDNA3.1zeo para la clonación de las proteínas de la membrana. Es necesario incluir la secuencia de la proteína Core (C) así como las secuencias de ambas glicoproteínas de la envoltura con sus correspondientes dominios transmembrana (E1 y E2).

Usamos para ello la construcción preexistente en el laboratorio pCDNA3.1zeo C₁₃₂E1E2 (H77) [347] que contiene desde el residuo 132 de la proteína Core hasta el final de E2, tal y como aparecen en la poliproteína del virus (figura 38).

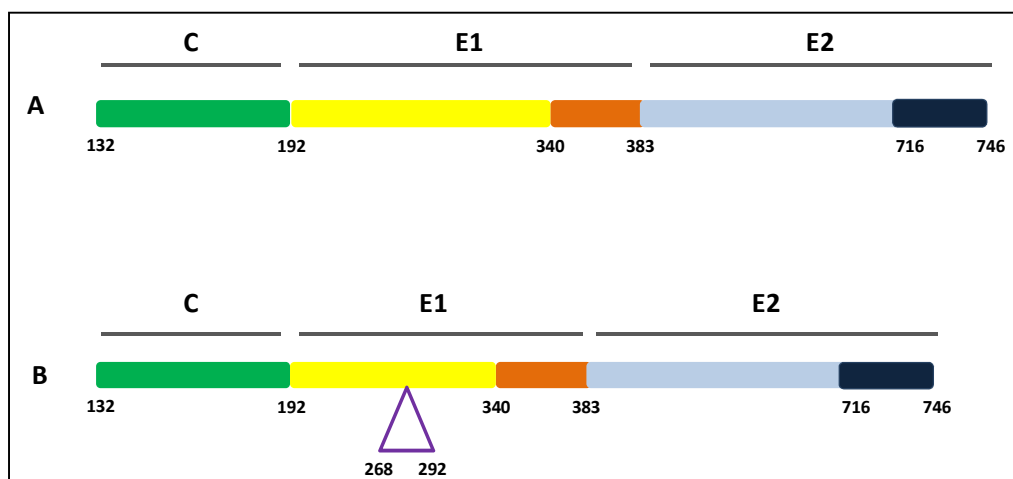


Figura 38. Representación esquemática del modelo de clonación de pCDNA-C₁₃₂E1_{Δ268-292}E2. A) Representación de la construcción C₁₃₂E1E2 utilizada como molde y como control. B) Esquema de la delección de la región 268-292 de E1 para construir el mutante C₁₃₂E1_{Δ268-292}E2. En verde se representa la proteína C, en amarillo E1 con su región transmembrana en naranja y en azul E2 con su región transmembrana en azul oscuro. Los números representan los residuos que delimitan cada dominio. En morado se representan los residuos delecionados.

La estrategia de clonación diseñada es la misma que la utilizada en el caso de E2E1 Δ 268-292 y está basada en el método diseñado por Pogulis [344]. En este caso, los oligos utilizados para los extremos en la primera PCR fueron:

- pENF1-F: 5'- GGT GGG AGG TCT ATA TAA -3'

Este oligo hibrida con los nucleótidos 793-811 del plásmido pCDNA3.1zeo, 159 bases por delante del sitio de clonación *EcoRI*.

- pCDNA-3GBH-R: 5'- GGA GGG GCA AAC AAC AGA TG -3'

Este oligo hibrida con los nucleótidos 1022-1039 del plásmido pCDNA3.1zeo, 30 bases por detrás del sitio de clonación *XbaI*.

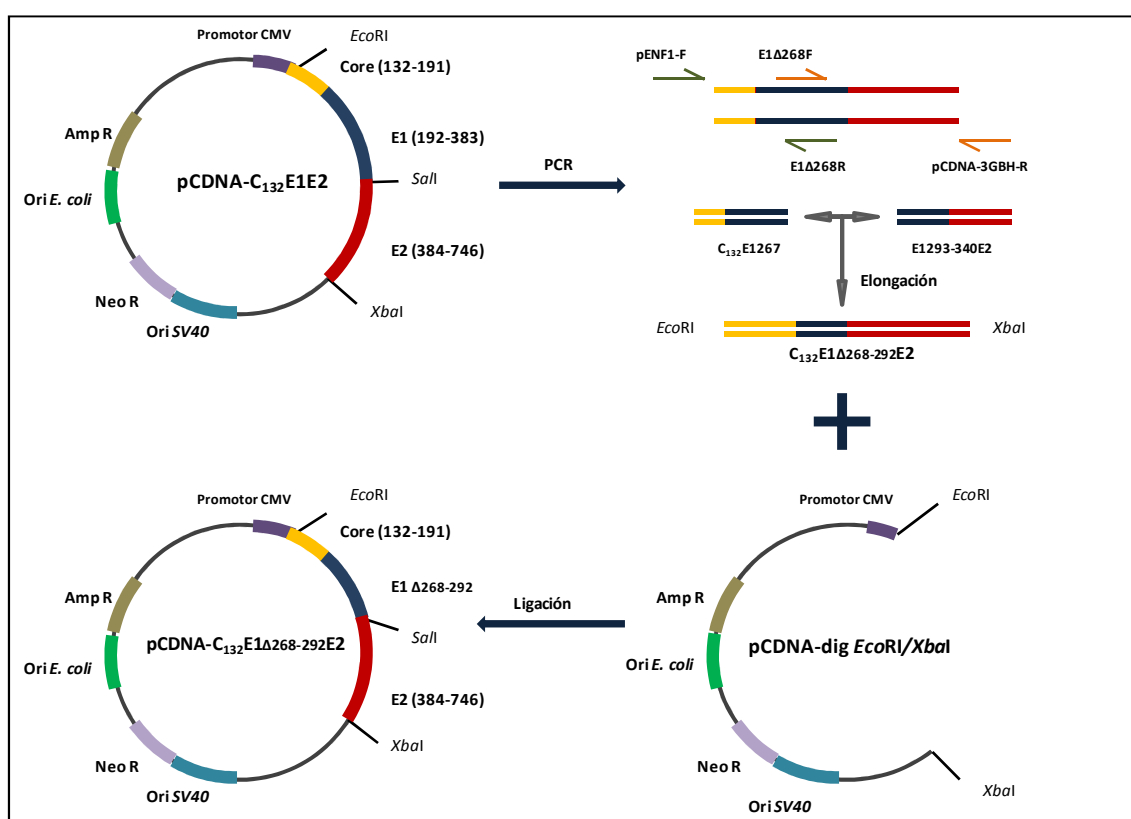


Figura 39. Esquema de obtención del plásmido pCDNA3.1zeoC₁₃₂E1 Δ 268-292E2. El fragmento correspondiente a la proteína quimérica C₁₃₂E1 Δ 268-292E2, obtenido mediante PCR con los cebadores indicados, fue digerido, al igual que el plásmido, con las enzimas de restricción *EcoRI*/*XbaI* para ser posteriormente ligados y llevar a cabo la transformación de células de *E. coli*.

Los cebadores internos, E1 Δ 268F y E1 Δ 268R, son los descritos anteriormente para la obtención del plásmido recombinante pAcGP67A-E2E1 Δ 268-292. Utilizando como molde el pCDNA-C₁₃₂E1E2, se obtienen por PCR los fragmentos C₁₃₂E1₂₆₇ (a partir de los oligos pENF1-F y E1 Δ 268R) y E1₂₉₃₋₂₈₃E2 (a partir de los oligos E1 Δ 268F y pCDNA-3GBH-

R). Estos dos fragmentos se fusionarán mediante una PCR de elongación, en ausencia de cebadores.

A continuación, se lleva a cabo una tercera PCR utilizando el producto de la segunda PCR como molde y los oligonucleótidos de los extremos (pENF1-F y pCDN-3GBH-R) como cebadores, lo cual permitió la amplificación del fragmento de DNA con la región de interés suprimida.

Finalmente, la secuencia completa de C₁₃₂E1_{Δ268-292}E2 obtenida de esta PCR se inserta en el vector pCDNA3.1zeo mediante digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XbaI* y posterior ligación obteniéndose el plásmido pCDNA-C₁₃₂E1_{Δ268-292}E2 (figura 39).

5.1.5.2. Expresión de las proteínas e incorporación a la superficie de las partículas

Una vez obtenido el plásmido recombinante, se procedió a la producción de pseudopartículas mediante la transfección de las células HEK 293T y a la determinación de su capacidad de entrada en células Huh7. Como controles negativo y positivo de dicha entrada se han usado las HCVpp sin envoltura y las HCVpp C₁₃₂E1E2, respectivamente.

En términos de producción de las diferentes pseudopartículas, se comprobó primero el correcto procesamiento e incorporación de las glicoproteínas E1 en su forma completa y delecionada (E1_{Δ268-292}) y E2 en la superficie de las mismas. Para ello, se evaluó mediante inmunodetección su expresión, tanto en el lisado de las células HEK 293T transfectadas como en las partículas obtenidas. En el caso de las pseudopartículas, para conseguir ver la expresión de E1 y E2 fue necesario concentrarlas mediante ultracentrifugación, tal y como se describe en el apartado 4.15.1 de Materiales y Métodos. Ambas proteínas se expresan en niveles comparables y tanto las HCVpp C₁₃₂E1E2 como las correspondientes al mutante de deleción, presentan una cantidad de E1 y E2 similar en su superficie (figura 40).

En cuanto a la capacidad de entrada de las partículas en las células diana, se evaluó la señal de luminiscencia en cada caso. Esta luminiscencia proviene de la expresión del gen de la luciferasa en las células Huh7 una vez que son infectadas con las HCVpp portadoras de dicho gen. Los resultados muestran que la actividad luciferasa se ve drásticamente disminuida (95%) para el mutante C₁₃₂E1_{Δ268-292}E2 en el cual se ha delecionado el péptido fusogénico descrito para E1 (figura 41). Estos resultados confirman la implicación de dicha región en la fusión de las membranas viral y celular, impidiendo la liberación del material genético al interior de las células Huh7.

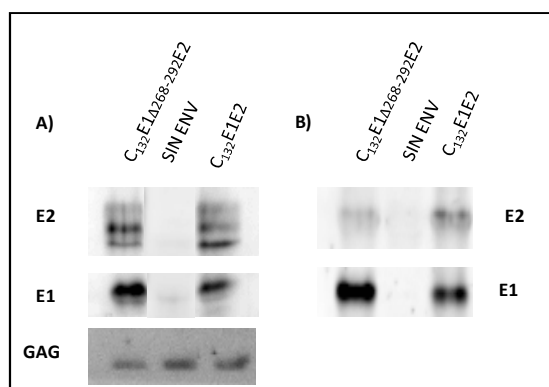


Figura 40. Inmunodetección de las glicoproteínas E1 y E2 presentes en las HCVpp purificadas (A) y en el lisado de las células HEK 293T transfectadas (B). Para la detección de E2 se utilizó una mezcla de anticuerpos monoclonales, AP33 y ALP198. Para detectar E1 se empleó el anticuerpo monoclonal A4. Los datos “sin envoltura” corresponden al control negativo que carece de las glicoproteínas del HCV en su superficie. La detección de la proteína GAG es un control de carga de las pseudopartículas y es detectada empleando un anticuerpo policlonal de rata, CRL1912.

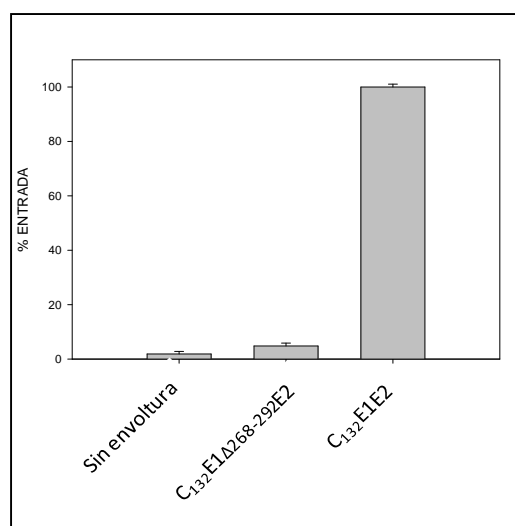


Figura 41. Infección de células Huh7 con HCVpp C₁₃₂E1E2 y el mutante de delección C₁₃₂E1Δ₂₆₈₋₂₉₂E2. El ensayo se llevó a cabo en una placa de 24 pocillos, infectando con 150 μl de HCVpp/pocillo durante 3 h a 37 °C. Cada medida se realiza por triplicado. Las RLUs (del inglés “Relative Luminiscence Units”) han sido medidas tras tres días de infección a 37 °C. Las barras de error han sido calculadas con los datos de tres experimentos independientes. Se considera el 100% de capacidad de entrada de las HCVpp en células Huh7 como el valor medio de las RLUs obtenido para C₁₃₂E1E2.

La correcta producción de las glicoproteínas por parte de las células empaquetadoras así como la correcta incorporación de éstas a la superficie de las partículas indica que la variación en la luminiscencia no ha sido alterada por la producción y procesamiento de dichas proteínas, sino que es una consecuencia directa de la ausencia de la región 268-292 de E1.

5.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS DOMINIOS TRANSMEMBRANA DE LAS GLICOPROTEÍNAS DE LA ENVOLTURA E1 Y E2

A lo largo de los últimos años, se ha descrito la importancia que tienen en la heterodimerización de las proteínas de la envoltura del HCV las interacciones producidas entre sus dominios transmembrana y, más concretamente, la presencia de un puente salino formado por los residuos Lys370 de E1 y Asp728 de E2 [173, 174].

Con objeto de caracterizar la capacidad de inserción de estos dominios transmembrana en una bicapa lipídica y de determinar la formación del heterodímero funcional, se han llevado a cabo estudios de integración en membrana (Lep) y de interacción en el seno de bicapas lipídicas *in vivo* (BiFC). Además, se ha estudiado, mediante la formación de partículas infectivas del HCV (HCVpp), la implicación de diferentes residuos en la capacidad para formar heterodímeros funcionales biológicamente.

Para poder estudiar la importancia del puente salino, se mutaron los residuos implicados en su formación. Las sustituciones llevadas a cabo fueron por alaninas para anularlo (K370A y D728A) y por el aminoácido cargado contrario para tratar de invertirlo (K370D y D728K).

Además, si observamos la composición de aminoácidos de las regiones definidas como transmembrana para E1 y E2, destaca la presencia de tres cargas (figura 42). Dos de ellas (Lys370 y Asp728) estarían neutralizadas por la formación de un puente salino. Sin embargo, la Arg en posición 730 de E2 quedaría libre en el interior de la bicapa y, dado la presencia del puente salino, enfrentada al entorno hidrofóbico de los lípidos. Se pretende, por lo tanto, estudiar la importancia de su tamaño y carga. Para ello, se generaron mutantes en los que se anulaba la carga introduciendo en su lugar aminoácidos de diferente tamaño (R730A y R730W), un mutante que mantenía la carga disminuyendo el tamaño (R730K) y un cambio de carga en dicha posición introduciendo un aminoácido ácido (R730D). Todos estos mutantes están reflejados en la figura 42.

Para la generación de todos los mutantes se ha aprovechado la disponibilidad en el laboratorio del plásmido pCDNA3.1zeoC₁₃₂E1E2, que contiene las secuencias que codifican las proteínas E1 y E2 completas, incluidos los dominios transmembrana. Así, mediante mutagénesis dirigida, se generaron los diferentes pCDNA3.1zeoC₁₃₂E1*E2 o pCDNA3.1zeoC₁₃₂E1E2* con las correspondientes mutaciones puntuales (*) en las regiones transmembrana de E1 y E2.

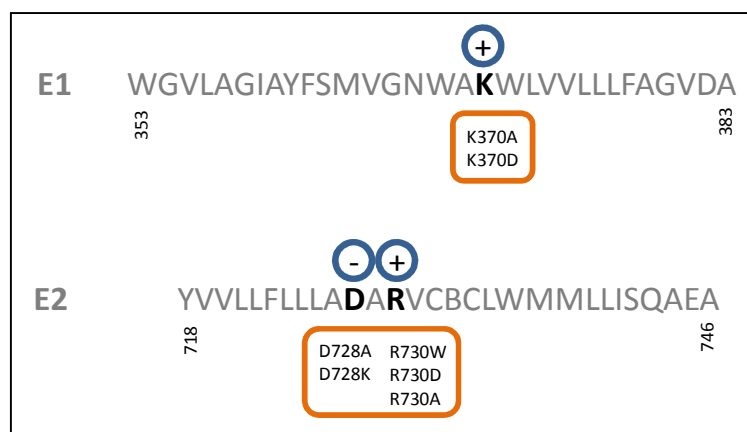


Figura 42. Secuencias de los dominios transmembrana de las proteínas E1 y E2. En negrita se muestran los residuos cargados de cada secuencia y su correspondiente carga en la parte superior. En los cuadros naranjas se describen los diferentes mutantes usados para caracterizar las interacciones. Los números representan la posición que ocupan los residuos de los extremos en la poliproteína del HCV.

En concreto, todos los mutantes fueron obtenidos mediante la misma estrategia de clonación utilizando el método Quick Change y variando los cebadores utilizados para ello, tal y como se indica en el apartado 4.1 de Materiales y Métodos. Este método consiste en el uso de un único par de cebadores complementarios de entorno a 40 nucleótidos que permite la sustitución de un número pequeño de bases en su parte central mediante PCR. Un esquema del procedimiento seguido se puede observar en la figura 43.

Los cebadores directos (F) utilizados para cada mutante se muestran a continuación. Los nucleótidos marcados en rojo indican las variaciones incluidas con respecto a la secuencia original. Sólo un aminoácido es sustituido (negrita) en cada caso por lo que el resto de variaciones no supone modificación de aminoácidos pero elimina (-) o introduce (+) una diana de restricción (subrayado) para facilitar su identificación. Los números representan la posición de los aminoácidos que delimitan el cebador. Los cebadores reversos (R) (no mostrados) son absolutamente complementarios a los directos (F).

- E1K370A-F: 5'-(364) ATG GTG GGG AAC TGG GCT GCA GTC CTG GTA GTG CTG (375)- 3' (+ *Pst*I)
K₃₇₀A
- E1K370D-F: 5'-(365) GTG GGG AAC TGG GCG **GAC** GTA CTA GTA GTG CTG CTA (376)- 3' (+ *Spe*I)
K₃₇₀D
- E2D728A-F: 5'-(723) TTC CTT CTG CTT GCA **GCC GCG** CGG GTC TGC TCC TGC TTG (735)- 3' (+ *Xma*I)
D₇₂₈A

- E2D728K-F: 5'-(722) CTG TTC CTT CTG CTT GCA **AAG** GCC CGG GTC TGC TCC TGC TTG TGG (736)- 3' (+ *Xma*I)
D₇₂₈K
- E2R730A-F: 5'-(724) CTT CTG CTT GCA GAC GCG **GCC** GTC TGC TCC TGC TTG (735)- 3' (- *Bss*HII, + *Eag*I)
R₇₃₀A
- E2R730D-F: 5'-(724) CTT CTG CTT GCA GAC GCG **GAC** GTC TGC TCC TGC TTG (735)- 3' (- *Bss*HII)
R₇₃₀D
- E2R730W-F: 5'-(725) CTG CTT GCA GAC GCG **TGG** GTC TGC TCC TGC TTG (735)- 3' (- *Bss*HII)
R₇₃₀W
- E2R730K-F: 5'-(725) CTG CTT GCA GAC GCG **AAG** GTC TGC TCC TGC TTG (735)- 3' (- *Bss*HII)
R₇₃₀K

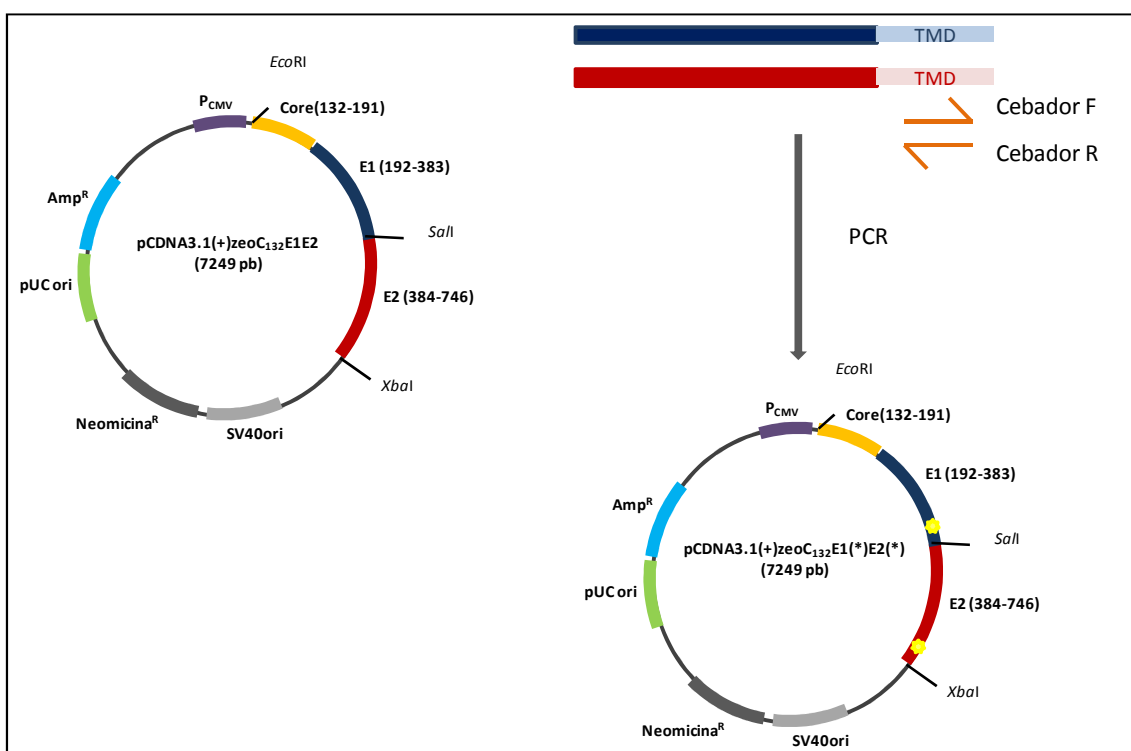


Figura 43. Representación esquemática de la obtención de los plásmidos recombinantes pCDNA3.1zeoC₁₃₂E1*E2 y pCDNA3.1zeoC₁₃₂E1E2*. Los cebadores complementarios son utilizados en una PCR directamente sobre el plásmido pCDNA3.1(+)-zeoC₁₃₂E1E2 de la cepa H77. El resultado de dicha PCR son plásmidos que contienen la sustitución de bases deseadas (estrellas amarillas). La digestión con *Dpn*I permite la degradación de los plásmidos superenrollados usados como molde durante la PCR pero conserva los nuevos plásmidos mellados. La transformación de esta mezcla de PCR en células competentes supondrá la obtención de cada uno de los diferentes mutantes.

Como se detallará más adelante, los pCDNA mutantes producidos fueron posteriormente utilizados como molde para la obtención, por PCR, de los diferentes plásmidos pGEM1-Lep-E1/E2 y pBiFC-VC-E1/E2 o pBiFC-VN-E1/E2 utilizados para los estudios de integración en membrana y heterodimerización, respectivamente.

En primer lugar, se estudió la capacidad de cada segmento transmembrana, con su mutante de sustitución correspondiente, de integrarse en una bicapa lipídica siendo éste el paso crítico para el resto de estudios.

5.2.1. CARACTERIZACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INTEGRACIÓN EN MEMBRANAS

Para determinar la capacidad que tiene un segmento transmembrana de insertarse en la misma se llevó a cabo la clonación de las regiones transmembrana de E1 y E2 en el dominio luminal P2 de la proteasa integral de membrana *Leader peptidase* (Lep). La proteína Lep consiste en dos segmentos transmembrana denominados H1 y H2 conectados por un lazo corto citoplásmico (P1) y un largo dominio C-terminal llamado lazo 2 (P2). Esta proteína se inserta en el retículo endoplásmico derivado de membranas microsomales con ambos extremos localizados en el lumen. El segmento que se quiere estudiar se inserta en el lazo P2 flanqueado por dos dianas de N-glicosilación [348].

Experimentalmente, el sistema se basa en el uso del preparado de reticulocitos TNT Sp6 Quick Master Mix (Promega), que contiene todo el material requerido para llevar a cabo la transcripción-traducción in vitro de la proteína modificada con el inserto de interés: transcriptasa, ribosomas, tRNA y aminoácidos excepto metionina que se añade marcada con ³⁵S. A este preparado hay que añadir una pequeña cantidad de microsomas o extractos de membrana de retículo de páncreas de perro, en los que se insertará la proteína traducida y en los que se llevarán a cabo las glicosilaciones correspondientes por la OST [349].

Los microsomas contienen la enzima oligosacariltransferasa (OST) encargada de añadir las glicosilaciones en las asparaginas de la secuencia N-X-S/T, siempre que X no sea prolina y sólo en el caso de que esta secuencia consenso quede hacia la cara externa de la membrana. Es decir, glicosilará ambos sitios si el segmento de estudio no se inserta y tan sólo el primero si el segmento transmembrana se inserta en la misma como muestra la figura 44. La monoglicosilación supone un incremento de la masa molecular de la proteína de 2.5 kDa con respecto al tamaño observado al expresar Lep en ausencia de microsomas. Un aumento de 5 kDa se observa cuando se produce doble glicosilación [348].

El grado de integración del segmento de estudio se expresa como porcentaje (p), que se cuantifica en geles de poliacrilamida PAGE-SDS midiendo la fracción de moléculas monoglicosiladas (f_{1g}) frente a las doblemente glicosiladas (f_{2g}):

$$p = [f_{1g} / (f_{1g} + f_{2g})] \times 100$$

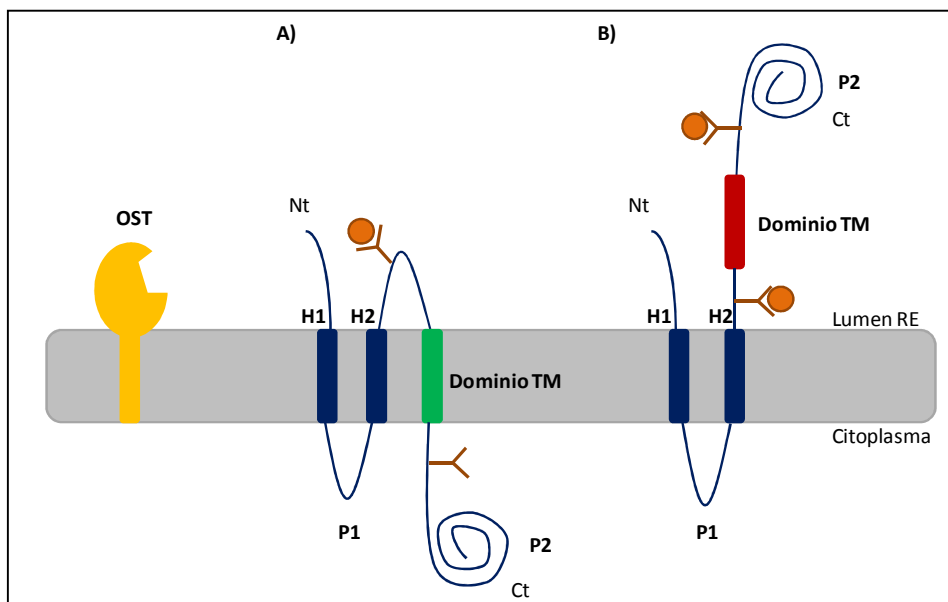


Figura 44. Representación esquemática de la construcción de la *Leader peptidase* (Lep) para estudiar la capacidad de integración de un segmento transmembrana. Los segmentos verde y rojo representan el dominio transmembrana de estudio integrado (A) o translocado (B), respectivamente. En naranja se representan los sitios de glicosilación, apareciendo un círculo si están glicosilados. La oligosacariltransferasa (OST) en amarillo tiene su actividad catalítica hacia el lumen del retículo.

Cabe la posibilidad de que el dominio transmembrana de estudio quede asociado a la membrana por la cara externa por lo que la segunda diana de glicosilación quedaría tan próxima a la membrana, que no sería glicosilada por la OST, de modo que podría parecer que se ha producido la integración. Para solventar este problema, la muestra es tratada con proteinasa K que degrada todos los fragmentos de proteína que queden en la cara citoplásmica de la membrana, de modo que obtendremos diferentes patrones de proteolisis según se haya producido o no la integración (figura 45).

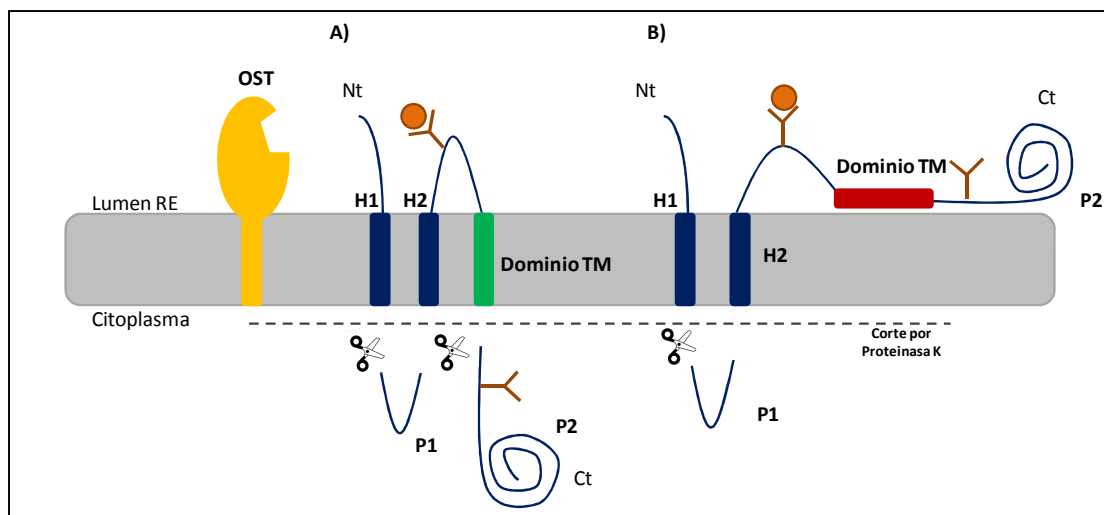


Figura 45. Representación esquemática de la construcción de la *Leader peptidase* (Lep) para estudiar la capacidad de integración de un segmento transmembrana. Los segmentos verde y rojo representan el dominio transmembrana de estudio integrado (A) o asociado (B), respectivamente. En naranja se representan los sitios de glicosilación, apareciendo un círculo si están glicosilados. La oligosacariltransferasa (OST) en amarillo tiene su actividad catalítica hacia el lumen del retículo. La proteínasa K se añade posteriormente y no atraviesa la membrana por lo que actuará en el citoplasma degradando los lazos presentes en esa región. Las tijeras representan la proteínasa K degradando las regiones citoplásmicas de proteína.

5.2.1.1. Obtención de los plásmidos recombinantes pGEM1-Lep-E1/E2

La clonación de los dominios transmembrana de las glicoproteínas E1 y E2 fue llevada a cabo por PCR. Para ello se diseñaron cebadores internos que amplifican las regiones transmembrana entre los residuos 353-383 para E1 y 718-746 para E2, añadiendo además, las dianas de restricción *SpeI* y *KpnI* necesarias para la clonación tras la segunda hélice de Lep y previo al lazo largo P2 en el C-terminal de la construcción. Un esquema de este proceso se muestra en la figura 46.

Los cebadores utilizados para ello se diseñaron de modo que fueran válidos para todos los mutantes de estudio. Se usaron, por lo tanto, como molde para la PCR los plásmidos pCDNA3.1(+)-zeoC₁₃₂E1*E2 o pCDNA3.1(+)-zeoC₁₃₂E1E2* anteriormente citados, en los cuales se había generado previamente cada mutante de sustitución.

A continuación se muestran las secuencias de dichos oligonucleótidos, apareciendo subrayadas las dianas *SpeI* y *KpnI*, en naranja la región flexible GPGG que define el principio y el final de la hélice y en azul las regiones de hibridación con E1 y E2, mostrándose debajo los aminoácidos a los que corresponde así como la posición que ocupan con respecto a la poliproteína.

- E1Lep-F: 5'- C GTA ACT AGT GGC GGA CCC GGG TGG GGA GTC CTG GCG GGC A - 3'
SpeI
W₃₅₃ G V L A G₃₅₈
- E1Lep-R: 5'- A GGT GGT ACC TG CCC GGG TCC GCC CGC GTC GAC GCC GGC AAA - 3'
KpnI
A₃₈₃ D V G A F₃₇₈
- E2Lep-F: 5'- C GTA ACT AGT GGC GGA CCC GGG TAC GTC GTT CTC CTG TTC C - 3'
SpeI
Y₇₁₈ V V L L F₇₂₃
- E2Lep-R: 5'- A GGT GGT ACC TG CCC GGG TCC GCC GGC CTC AGC CTG GGA TAT G - 3'
KpnI
A₇₄₆ E A Q S I₇₄₁

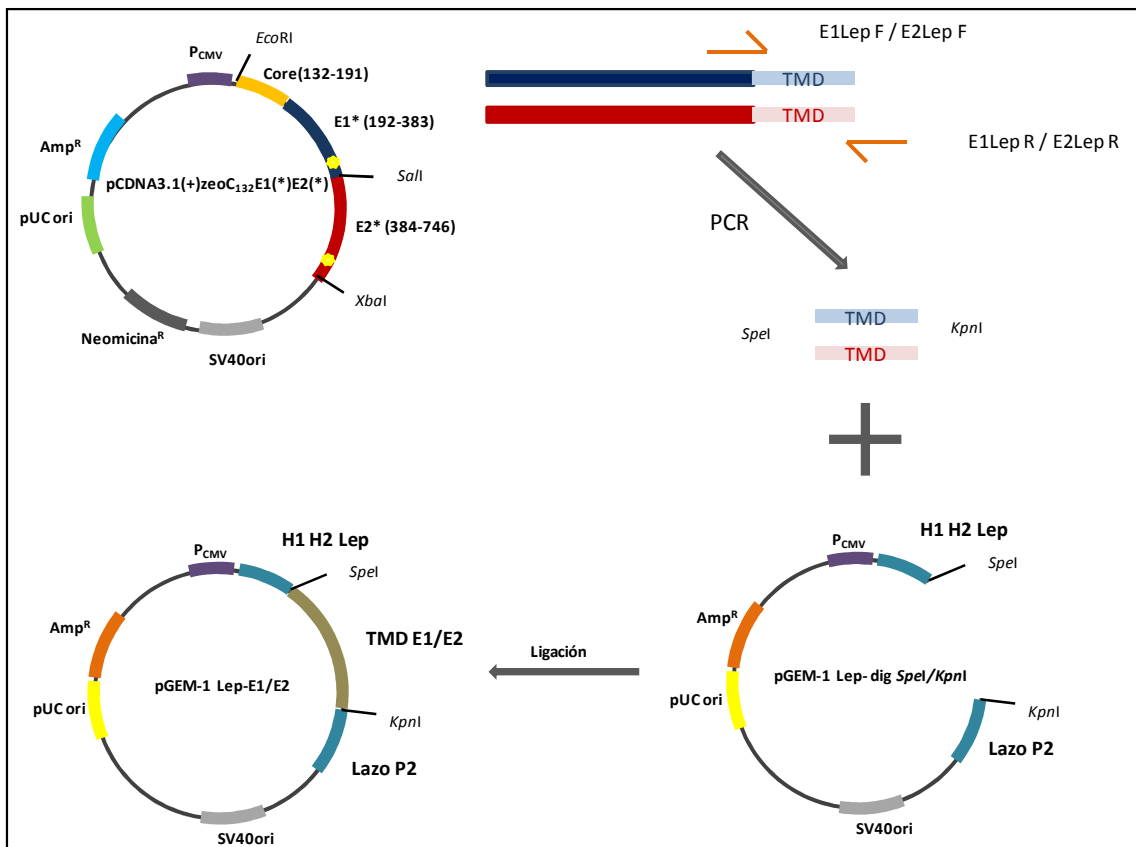


Figura 46. Representación esquemática de la obtención de los plásmidos recombinantes pGEM1-Lep-E1/E2. La clonación se realizó usando como molde los plásmidos pCDNA, donde los mutantes de sustitución se muestran con estrellas amarillas, insertando las dianas *SpeI/KpnI* en los cebadores. El plásmido obtenido es resistente a ampicilina y se puede propagar en *E. coli*.

5.2.1.2. Evaluación de la capacidad de integración mediante el sistema de traducción-glicosilación *in vitro*

Una vez obtenidos los plásmidos se procedió, en primer lugar, a la comprobación de la capacidad de inserción de las regiones transmembrana naturales de las glicoproteínas de la envoltura del HCV, E1 y E2. La figura 47 muestra la capacidad de ambos segmentos de insertarse en la membrana completamente. Para cada construcción, en el primer carril se observan las bandas correspondientes a la proteína sin glicosilar en ausencia de microsomas. En los carriles intermedios, junto a las bandas sin glicosilar, se observan bandas monoglicosiladas correspondientes a la integración de ambas regiones transmembrana en los microsomas. En ningún caso se observa banda doblemente glicosilada, por lo que la inserción es total. Para descartar la asociación a la membrana, se añade proteinasa K, tal y como se indica en el apartado 4.13.1 de Materiales y Métodos, que genera un patrón de degradación semejante para ambas proteínas debido al corte de ambos lazos en la cara citoplásmica. La diferencia de intensidad en las bandas de E1 y E2 se debe a la variación de los niveles de expresión de cada una de ellas, así como a pequeños procesos de degradación de las proteínas sintetizadas que derivan en bandas de menor tamaño más intensas en E1 que en E2.

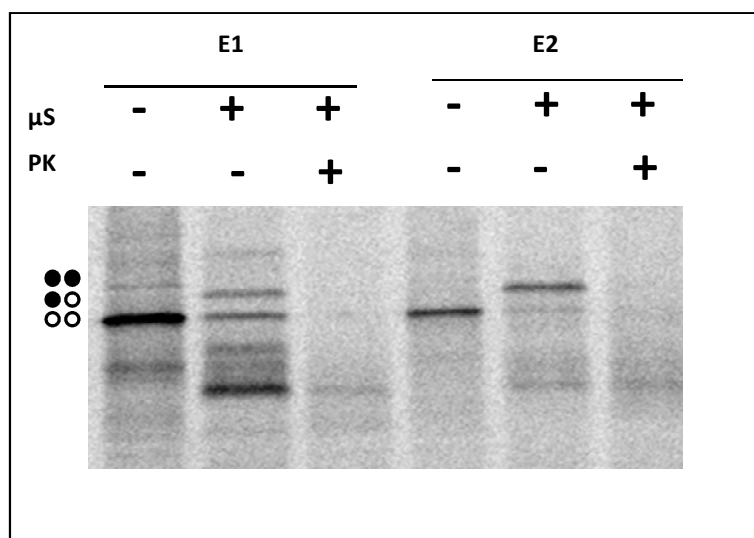


Figura 47. Autorradiografía correspondiente al ensayo de integración en membrana de las regiones TMD de E1 y E2. Se indica con signos (+/-) la presencia o ausencia de microsomas (μ S) y proteinasa K (PK) en cada preparado. Los círculos blancos indican ausencia de glicosilación mientras que los círculos negros indican su presencia en cada una de las dos dianas de glicosilación.

Una vez establecida la integración de los segmentos transmembrana de las proteínas nativas, se procedió al estudio de los diferentes mutantes de sustitución,

evaluando su capacidad de insertarse en la membrana y descartando la posibilidad de que se produzca asociación a la misma usando para ello proteinasa K.

Los resultados obtenidos en presencia de microsomas (figura 48) muestran la capacidad de todos los mutantes para integrarse más de un 95% en la membrana, excepto en los casos de R730K cuya inserción es de un 85%, y R370D cuya inserción es de un 72%. Los porcentajes de inserción se evaluaron por densitometrado de las bandas mono y doblemente glicosiladas, usando para ello el programa Multi Gauge (Fujifilm). Sólo en estos dos últimos casos se observa banda correspondiente a doble glicosilación debida a la presencia de ambas dianas en la cara luminal de los microsomas, al menos, en el 15% y 28% de las proteínas Lep R730K y R730D sintetizadas. Como control se utiliza la región transmembrana de E1 en ausencia de microsomas (- μ S) que no sufrirá glicosilaciones pudiéndose considerar como el tamaño de las proteínas Lep-E1 y Lep-E2 nativas.

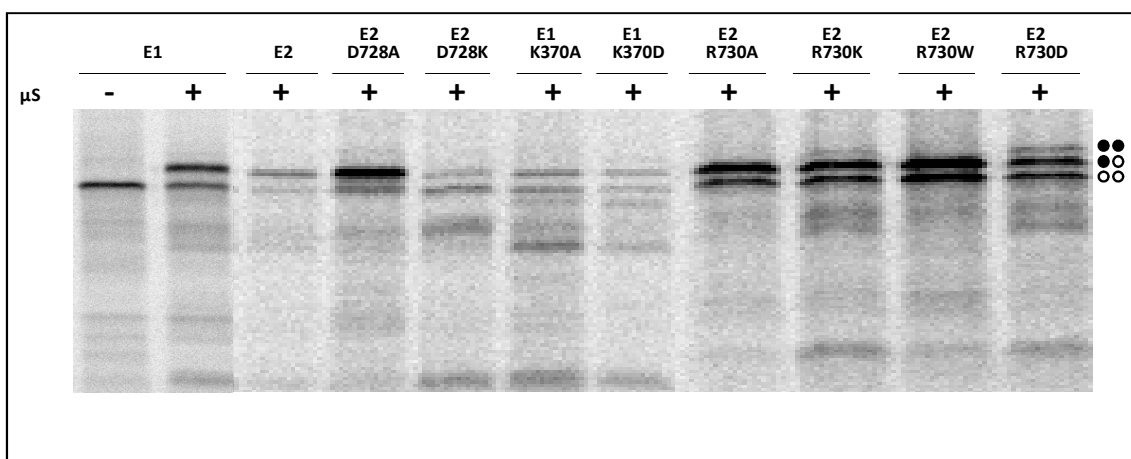


Figura 48. Autorradiografía correspondiente al ensayo de integración en membrana de los diferentes mutantes de sustitución de las regiones TMD de E1 y E2. En todos los casos los ensayos se han llevado a cabo en ausencia de proteinasa K, indicando la presencia o ausencia de microsomas (μ S) con signos (-/+). Los círculos blancos indican ausencia de glicosilación mientras que los círculos negros indican su presencia en cada una de las dos dianas de glicosilación.

El tratamiento con proteinasa K (figura 49) revela el mismo patrón en casi todos los casos, correspondiente a una degradación total del extenso lazo P2 presente en C-terminal. Ello indica que el péptido analizado se encuentra en el interior de la membrana y, que por lo tanto, se ha producido inserción y no asociación a la misma para todos los mutantes. Como control se muestran todas las posibles combinaciones de μ S y PK para E2. La mayor evidencia de proteína sin degradar se produce en el caso del mutante R730D cuya integración es menor.

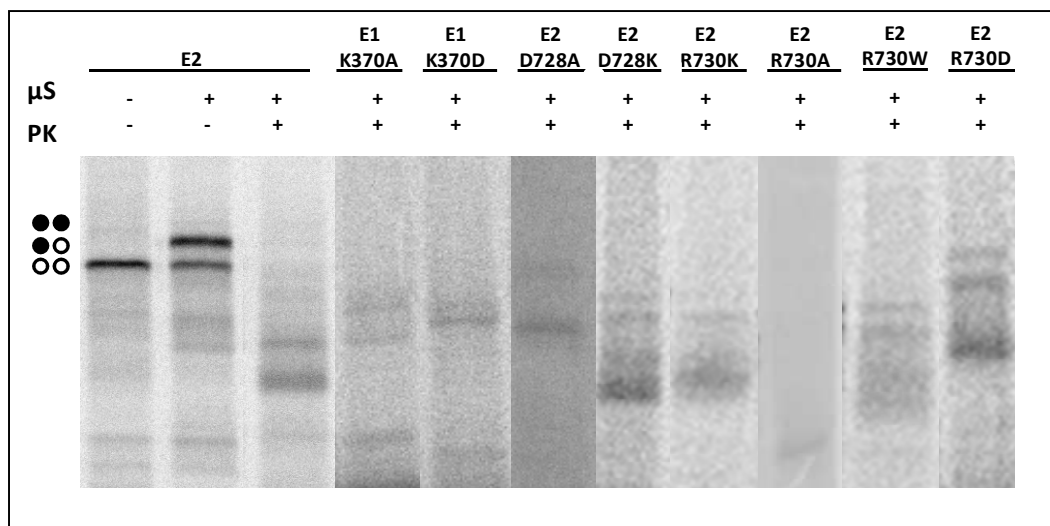


Figura 49. Autorradiografía correspondiente a los carriles de las proteínas tratadas con proteinasa K. Se indica con signos (+/-) la presencia o ausencia de microsomas (μS) y proteinasa K (PK) en cada preparado. Los círculos blancos indican ausencia de glicosilación mientras que los círculos negros indican su presencia en cada una de las dos dianas de glicosilación.

El conjunto de los datos obtenidos muestra que la inserción de un residuo de aspártico en la posición 730 de E2 altera notablemente la capacidad de integración en la membrana de la proteína, reduciéndola casi un 30% lo cual se puede deber a una repulsión con el residuo de aspártico presente en la posición 728. La mutación de arginina por lisina en posición 730 de E2 muestra una pérdida menor de integración, manteniéndose la inserción en torno al 85%. En el resto de los mutantes, las proteínas se insertan en la membrana de manera similar a sus correspondientes péptidos naturales (dominios transmembrana de E1 y E2). Por lo tanto, podemos concluir que excepto R730K y R730D, el resto de mutantes se integran en la membrana a pesar de haber sufrido modificaciones importantes en su secuencia.

5.2.2. CARACTERIZACIÓN DEL PRIMER RESIDUO DE LOS DOMINIOS TRANSMEMBRANA DE LAS GLICOPROTEÍNAS DE LA ENVOLTURA E1 Y E2

Hasta el momento, ningún grupo de investigación se ha planteado cuál es el comienzo exacto de los segmentos transmembrana de las glicoproteínas de la envoltura del HCV. El carácter altamente hidrofóbico de los últimos 30 residuos de ambas proteínas ha hecho suponer que todos formaban parte del segmento transmembrana, a pesar de que eso implica la presencia de una hélice extremadamente larga. A este respecto, se ha postulado la posibilidad de que la hélice tuviera una ruptura dentro de la membrana y formara una horquilla que permitiera que ésta se acoplara mejor al grosor de la bicapa lipídica [171, 172] (figura 12).

Aprovechando el sistema de traducción-glicosilación *in vitro*, que define la integración o no, de un dominio transmembrana en una bicapa lipídica, se ha determinado con exactitud, el primer residuo de las hélices de anclaje a membrana de ambas glicoproteínas de la envoltura del HCV. Para ello ha sido necesario llevar a cabo una modificación en las construcciones pGEM1-Lep previamente obtenidas. Así, una vez conocida la capacidad de los segmentos E1 y E2 para integrarse en la membrana, se ha clonado una nueva diana de glicosilación a una distancia del primer residuo teórico de la hélice que varía entre 3 y 17 aminoácidos (figura 50). Esta técnica ha sido previamente utilizada para otros fines como la determinación de los efectos de residuos de prolina en la ruptura de hélices transmembrana de diferentes longitudes y orientaciones [350].

La oligosacaryltransferasa (OST) tiene su sitio catalítico a una distancia tal que sólo es capaz de glicosilar las asparaginas que se sitúen a una distancia de 14 residuos de la bicapa lipídica cuando la diana de glicosilación se encuentra en el Nt de la hélice [351]. De este modo, la proteína sintetizada e insertada estará doblemente glicosilada cuando la diana esté clonada a 14 residuos o más del primer residuo real del dominio transmembrana.

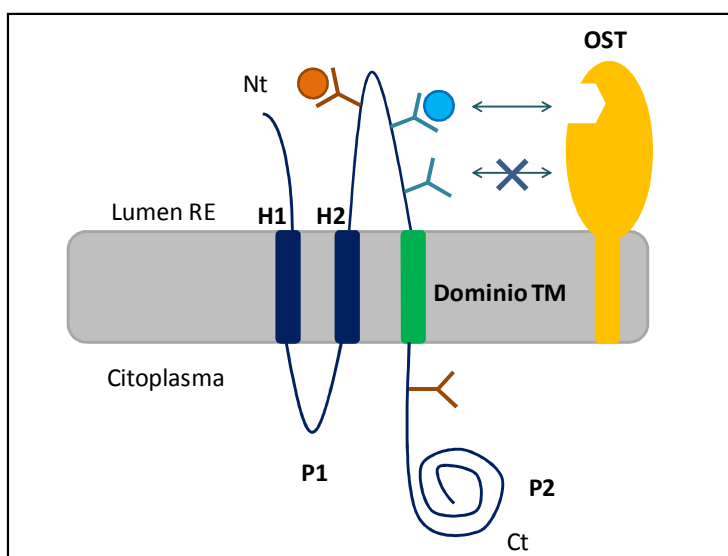


Figura 50. Representación esquemática de la construcción de la *Leader peptidase* (Lep) para estudiar el primer residuo del segmento transmembrana. El segmento verde representa el dominio transmembrana de estudio integrado. En naranja se representan los sitios de glicosilación apareciendo un círculo si están glicosilados. La nueva diana de glicosilación se muestra en color turquesa. La oligosacaryltransferasa (OST) en amarillo tiene su actividad catalítica hacia el lumen del retículo y su sitio activo accesible al residuo en posición 14 desde la membrana.

5.2.2.1. Obtención de los plásmidos recombinantes pGEM1-Lep-dX

Todos los mutantes generados se obtuvieron utilizando la misma estrategia de clonación, variando los cebadores utilizados para ello.

Se utilizó el método Quick Change basado en el uso de un único par de cebadores de en torno a 40 nucleótidos que permite, en este caso, la inserción de una diana de glicosilación a lo largo de la secuencia (figura 51). Los cebadores directos (F) utilizados para cada mutante se muestran a continuación. Los nucleótidos marcados en rojo indican las variaciones incluidas con respecto a la secuencia original. Los aminoácidos sustituidos se muestran en negrita, apareciendo en cursiva la diana de glicosilación que siempre será la secuencia NST (azul). En verde se muestra la secuencia GGPG completa o truncada que flanquea la hélice impidiendo su propagación. El resto de variaciones no supone ninguna modificación de aminoácidos pero elimina (-) o introduce (+) una diana de restricción (subrayado) para facilitar su identificación. Los cebadores reversos (R) (no mostrados) son absolutamente complementarios a los directos (F).

- E1d3-F: 5'- TCC GAG ACT AGT GGC **AAT TCC ACG** TGG GGA GTC CTG GCG -3' (-XmaI)
N S T W₃₅₃
- E1d5-F: 5'- CGT CTT TCC GAG ACT **AAT AGC ACA** CCC GGG TGG GGA GTC - 3' (-SpeI)
N S T P G W₃₅₃
- E1/E2d7-F: 5'- GGA ATT CGT CTT TCC **AAT AGT ACT** GGC GGA CCC GGG -3' (-SpeI)
N S T G G P G
- E1/E2d9-F: 5'- GAA AAT GGA ATT CGT **AAT TCC ACG** ACG AGT GGC GGA CCC GGG -3' (-SpeI)
N S T G G P G
- E1/E2d11-F: 5'- ACC AAA GAA AAT GGA **AAT AGT ACT** TCC GAG ACT AGT GGC -3' (-EcoRI)
N S T G
- E1/E2d13-F: 5'- GAA ACC AAA GAA AAT **AGT ACT** CGT CTT TCC GAG ACT- 3' (-EcoRI)
N S T
- E2d15-F: 5'- CCG AAA CAG GAA ACC **AAT TCA ACT** GGT ATT CGT CTT TCC GAG - 3' (-EcoRI)
N S T
- E2d17-F: 5'- GAA GTG CCG AAA CAG **AAC AGT ACT** GAA AAT GGA ATT CGT - 3' (+ScaI)
N S T

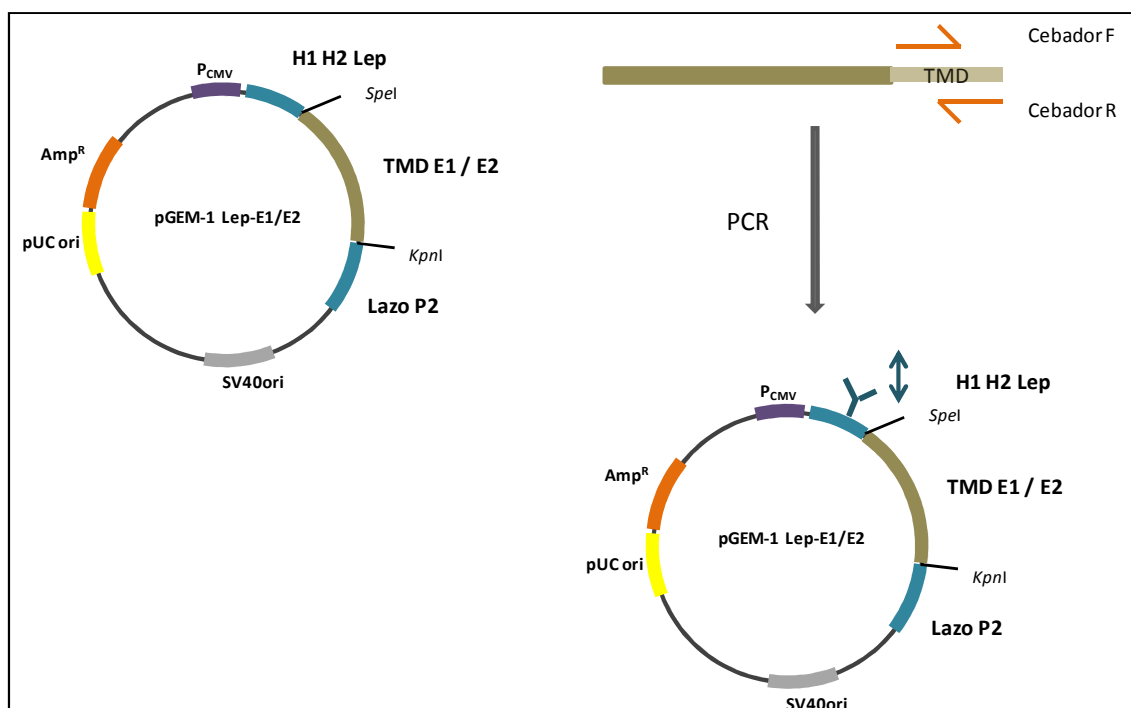


Figura 51. Representación esquemática de la obtención de los plásmidos recombinantes pGEM1-Lep-dX. Los cebadores complementarios son utilizados en una PCR directamente sobre los plásmidos pGEM1-Lep-E1/E2. El resultado de dicha PCR son plásmidos mellados conteniendo la sustitución de bases deseadas que introducen la diana de glicosilación (azul). La digestión con *DpnI* permite la degradación de los plásmidos superenrollados usados como molde durante la PCR pero conserva los nuevos plásmidos mellados. La transformación de esta mezcla de PCR en células competentes supondrá la obtención de cada uno de los diferentes mutantes.

5.2.2.2. Caracterización del nivel de glicosilación de las proteínas generadas con los plásmidos pGEM1-Lep-dX

Una vez obtenidos los plásmidos recombinantes pGEM1-Lep-dX se lleva a cabo la traducción-glicosilación *in vitro* como se describe en el apartado 4.13 de Materiales y Métodos.

Así, mediante autorradiografía, podemos observar los diferentes estados de glicosilación de cada proteína en función de la posición que ocupa la nueva diana NST introducida. Tanto los geles como la representación de la relación entre las bandas mono y doblemente glicosiladas se muestran en la figura 52.

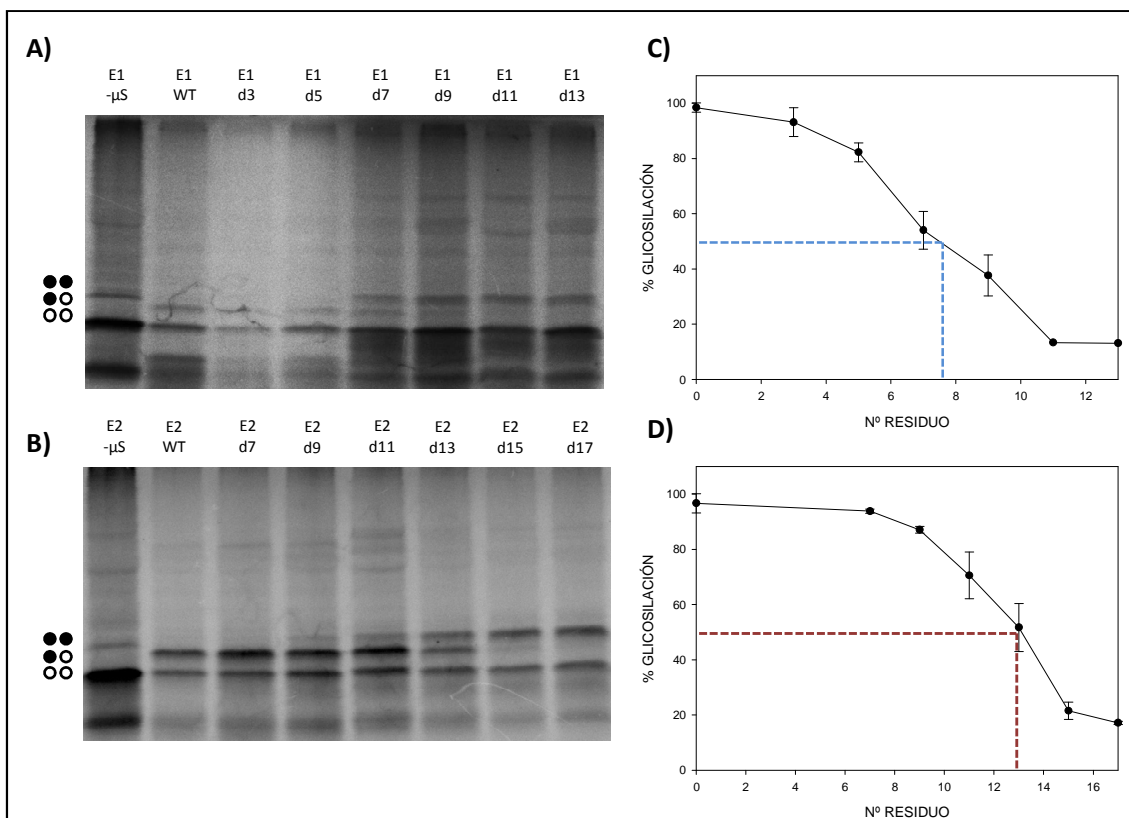


Figura 52. Niveles de glicosilación para las diferentes posiciones de la diana en E1 y E2.

A) y B) Autorradiografías correspondientes a la variación del nivel de glicosilación para las diferentes posiciones de la diana NST adicional en las regiones transmembrana de E1 y E2, respectivamente. C) y D) Variación del porcentaje de glicosilación con respecto a la posición de la diana para E1 y E2 respectivamente. En las autorradiografías, se muestra la banda de proteína en ausencia de microsomas (-μS) y por tanto de glicosilación. Los círculos blancos indican ausencia de glicosilación mientras que los círculos negros indican su presencia en cada una de las dos dianas de glicosilación. El porcentaje de glicosilación se calcula mediante la relación $f_{1g}/(f_{1g}+f_{2g}) \times 100$. Todos los densitometrados fueron llevados a cabo con el programa Multi Gauge (Fujifilm). Las líneas discontinuas marcan el punto de inflexión de la curva obtenida y su punto de corte con el residuo correspondiente.

Se define el residuo que ocupa la posición 14 con respecto a la bicapa según Nilsson y *col.* [351] a aquel en el cual el porcentaje de glicosilación es el 50%, siendo las bandas de proteína mono y doblemente glicosiladas iguales en intensidad. Se considera como residuo 1 el inmediatamente anterior al primer aminoácido transmembrana. Por lo tanto, para el caso de E2 el primer residuo transmembrana podría ser la Val719, contiguo a la Tyr718 descrita hasta el momento, ya que el residuo 14 definido por Nilsson se corresponde con el residuo 13 real según la secuencia. Sin embargo, para E1 el primer residuo transmembrana será el que está en torno a la posición 7/8 ya que el punto de inflexión se produce cuando la diana NST está situada en torno a 7/8 residuos del Trp353 considerado hasta ahora el primer residuo. El primer aminoácido transmembrana de E1 sería entonces la Ile359 o la Ala360.

5.2.3. CARACTERIZACIÓN DE LA CAPACIDAD DE HETERODIMERIZACIÓN DE LOS DOMINIOS TRANSMEMBRANA DE E1 Y E2

Para determinar la capacidad de los dominios transmembrana de E1 y E2 de interaccionar entre sí en un sistema *in vivo*, se recurrió a la expresión de los mismos en células de mamífero como proteínas de fusión de una proteína fluorescente usando el sistema BiFC. Este sistema se basa en la complementación de dos partes de una proteína fluorescente ancladas de manera independiente a dos dominios transmembrana diferentes. De este modo, sólo en el caso de que estos dos dominios se inserten en la membrana e interaccionen entre ellos se recuperará la fluorescencia [343] (figura 53). La proteína fluorescente utilizada en este caso es Venus, una proteína verde derivada de la GFP y con una mutación, I152L, que aumenta la relación señal-ruido facilitando así su cuantificación [335].

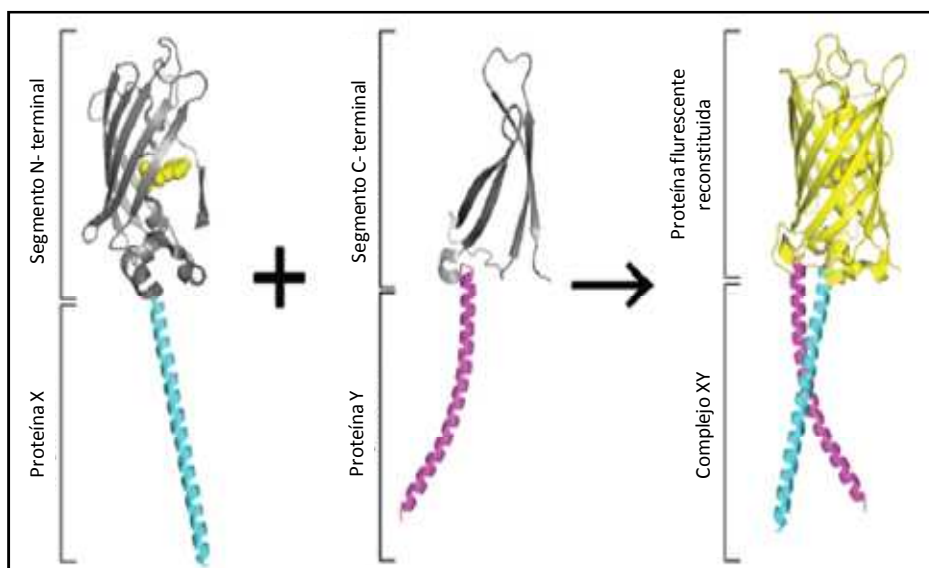


Figura 53. Representación esquemática del modelo de BiFC. La interacción de dos segmentos transmembrana supone la reconstitución de una proteína fluorescente y la obtención por lo tanto de una señal visible y cuantificable. Adaptada de [343].

Con objeto de analizar la interacción entre los segmentos transmembrana de las glicoproteínas E1 y E2, se recurrió a la transfección de células HeLa y la posterior cuantificación de la reconstrucción de la proteína fluorescente Venus mediante citometría de flujo. También se determinó la localización de dicha dimerización en retículo mediante microscopía confocal usando para tal fin un marcador de retículo endoplásmico.

5.2.3.1. Obtención de los plásmidos recombinantes pBiFC-VN-E1/E2 y pBiFC-VC-E1/E2

La clonación se llevó a cabo mediante PCR usando como moldes los correspondientes pCDNA3.1zeoC₁₃₂E1*E2 y pCDNA3.1zeoC₁₃₂E1E2* descritos previamente. Los cebadores utilizados, válidos para todas las construcciones de E1 y E2 se describen más adelante, mostrándose en azul los nucleótidos que hibridan con la secuencia y subrayadas las dianas de restricción. Los números muestran las posiciones que ocupan los correspondientes aminoácidos en la cadena polipeptídica. Un esquema del proceso de clonación se puede observar en la figura 54.

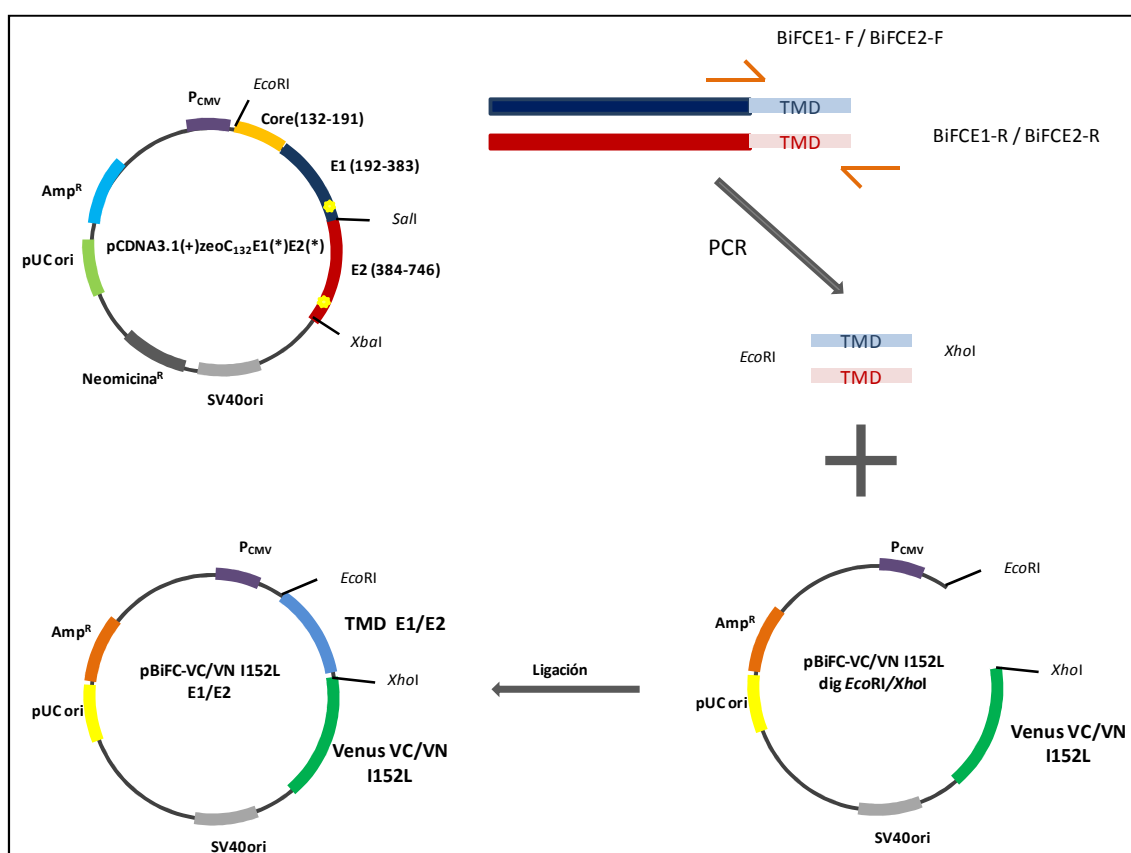


Figura 54. Representación esquemática de la obtención de los plásmidos pBiFC VC/VN-E1/E2. El proceso de clonación de los dominios transmembrana en los plásmidos pBiFC-VC y pBiFC-VN (I152L), los cuales contienen los dos fragmentos de la proteína fluorescente Venus, se realizó usando como molde los correspondientes pCDNAC₁₃₂E1E2 e insertando las dianas EcoRI/XhoI. El plásmido obtenido es resistente a ampicilina y se puede propagar en *E. coli*.

- BiFCE1-F: 5'- CC GAATTC TG TTT GGA GTC CTG GCG GGC - 3'
EcoRI W₃₅₃ G V L A G₃₅₈
- BiFCE1-R: 5' - C CGG TAC CTCGAG A CGC GTC GAC GCC GGC AAA - 3'
XhoI A₃₈₃ D V G A F₃₇₈

- BiFCE2-F: 5' - CC GAATTC GG TAC GTC GTT CTC CTG TTC - 3'
EcoRI Y₇₁₈ V V L L F₇₂₃
- BiFCE2-R: 5' - C CGG TAC CTCGAG A GGC CTC AGC CTG GGA TAT - 3'
XhoI A₇₄₆ E A Q S I₇₄₁

5.2.3.2. Estudio de la interacción entre los dominios transmembrana de E1 y E2

Una vez obtenidas todas las construcciones pBiFC, se determinó, en primer lugar, la correcta interacción y localización en el retículo endoplásmico de E1 y E2 por microscopía confocal, tal y como se describe en el apartado 4.14.1 de Materiales y Métodos. Para ello, se usaron las dos posibles combinaciones de E1 y E2 con cada uno de los dos plásmidos, E1VN-E2VC y E1VC-E2VN, para asegurar la interacción entre ambas, independientemente de la región de Venus asociada a cada una. Como control se utilizó la pareja Jun-Fos, péptidos solubles que interaccionan entre sí mediante una cremallera de leucina localizándose mayoritariamente en los nucleolos. Como control negativo se usó un mutante de Fos (Δ Fos) que anula la interacción entre ambos péptidos eliminando la complementación de fluorescencia en células.

En la figura 55 se pueden observar los controles positivo y negativo del sistema pBiFC, así como ambas combinaciones de Venus con E1 y E2. El marcaje con DAPI permite localizar el núcleo de las células dejando los nucleolos sin teñir. Es en estos orgánulos donde se produce mayormente la interacción Jun-Fos que se ve anulada con el mutante Δ Fos. La sonda fluorescente ER Tracker ha sido utilizada como marcador de retículo endoplásmico, observándose colocalización con la proteína Venus derivada de la heterodimerización de E1 y E2. El marcaje fluorescente se observa tanto para E2VN-E1VC como para E1VN-E2VC siendo de mayor intensidad en el primer caso. La colocalización Venus-ER Tracker demuestra, como ya se había descrito [164, 352], que estas proteínas se retienen en el retículo, una vez sintetizadas, donde interaccionan para formar heterodímeros estables, siendo las regiones transmembrana las responsables de dicha retención.

Una vez comprobada la expresión, heterodimerización y retención en el retículo de E1 y E2 se procede a determinar, tanto para las proteínas nativas como para los mutantes de sustitución generados, la capacidad de interacción. La cuantificación se lleva a cabo por citometría de flujo según se describe en el apartado 4.14.2 de Materiales y Métodos. Este método permite medir la fluorescencia correspondiente a la reconstrucción de Venus para preparaciones de células transfectadas con cada una de las posibles combinaciones de mutantes.

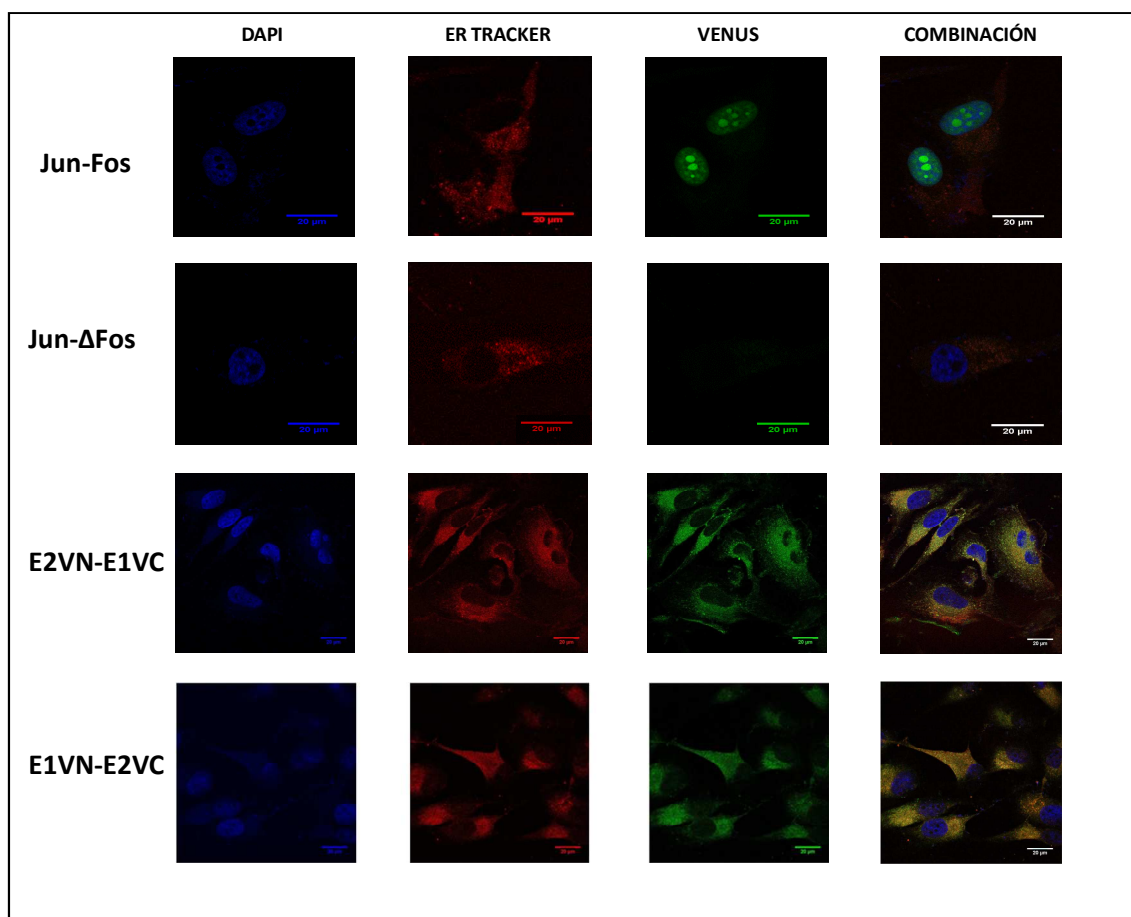


Figura 55. Localización de E1 y E2 en la membrana del retículo por microscopía confocal.

Como control positivo de interacción se utiliza la pareja Jun-Fos siendo la forma mutada, Δ Fos, el control negativo. Se comprobaron las dos combinaciones de E1-E2 con cada sección de la proteína Venus dando lugar a los pares E2VN-E1VC y E1VN-E2VC donde VN corresponde al fragmento Nt de Venus y VC al fragmento Ct. Se muestran las imágenes obtenidas para una misma célula o grupo de células en el canal del DAPI, en el del marcador de RE y en el de la proteína fluorescente Venus, así como la combinación de los tres canales para observar la colocalización.

Los resultados obtenidos en los ensayos de citometría se representan en forma de diagrama de dispersión, en función del tamaño y la complejidad de cada célula. De la región considerada como células vivas y disgregadas, se expresa la intensidad de fluorescencia como una distribución logarítmica en función del número de células, obteniéndose, finalmente, un valor de intensidad medio para el total de células y para el conjunto de células transfectadas. Al obtenerse siempre porcentajes similares de células transfectadas, la intensidad de la fluorescencia nos indica la calidad de la interacción entre ambos dominios transmembrana, considerándose mayor interacción cuanto mayor es dicha intensidad (figura 56).

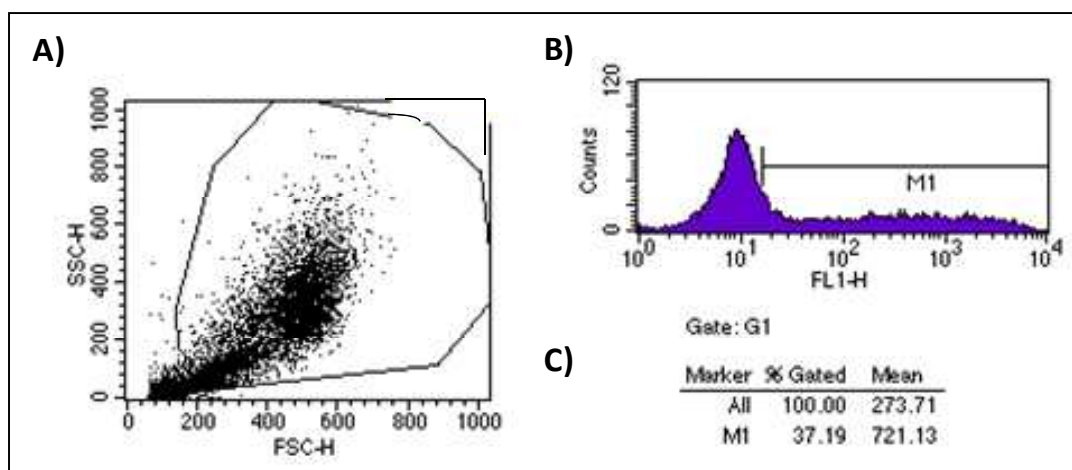


Figura 56. Resultados representativos de un ensayo de citometría. A) Distribución de la población de células en función de su tamaño relativo (*forward scatter*-FSC) y su granularidad relativa o complejidad interna (*side scatter* SSC). B) Análisis logarítmico de la intensidad de fluorescencia de la fracción de células señaladas en A frente al número de cuentas por cada intensidad. C) Intensidad de fluorescencia media del total de células (All) y de la fracción M1 determinada como fluorescencia no derivada de la señal de fondo. El porcentaje de células en M1 corresponde al porcentaje de células transfectadas para cada preparado.

Como control negativo para la realización de estos ensayos se utilizó la hélice H1 de la peptidasa Lep, de la cual no se han descrito interacciones previas y no presenta ninguna relación con las glicoproteínas de la envoltura del HCV. Los resultados muestran que E2 no interacciona con H1 pero E1 es capaz de establecer uniones inespecíficas con H1, probablemente de carácter hidrofóbico, que dan lugar a una señal de fluorescencia de un 40% del valor del control positivo (figura 57). Parece entonces que este control negativo no es el ideal para este sistema ya que deberíamos usar un mutante de E1 o de E2 que anulara completamente la interacción E1-E2 [343] y del cual carecemos puesto que nuestro objetivo es, precisamente, caracterizar dicha interacción. Sin embargo, nos da una idea de que los resultados obtenidos de ahora en adelante no serán debidos a un artefacto del método, ya que se ha observado en el par E2VN-H1VC una señal de fluorescencia prácticamente nula.

Los resultados de intensidad de fluorescencia obtenidos para E2VN-E1VC y E1VN-E2VC fueron parecidos, aunque se observó un 30% más de señal para la primera combinación (figura 57). Con base en este resultado, se clonaron los mutantes de E1 en pBiFC-VC y los mutantes de E2 en pBiFC-VN. El valor de intensidad obtenido con el par de proteínas nativas E2VN-E1VC se consideró como el 100%.

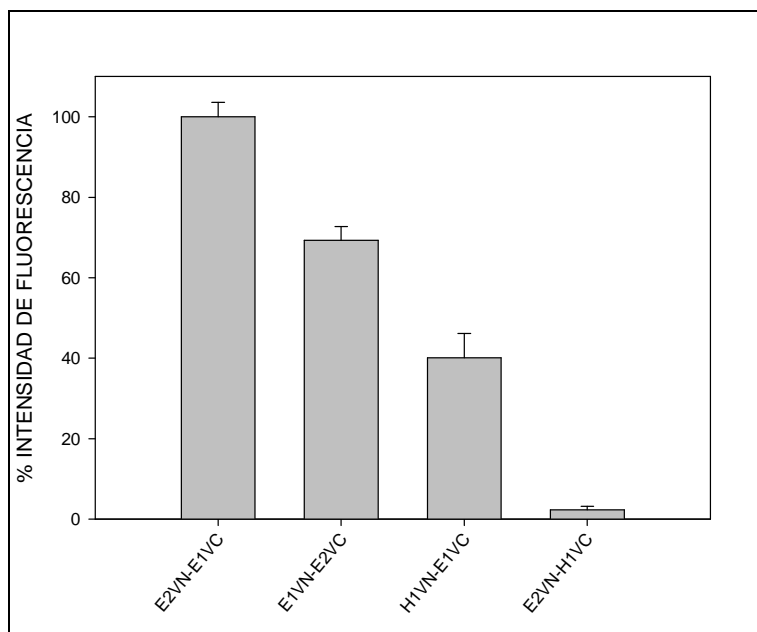


Figura 57. Representación de los resultados de citometría para los controles E1VN-E2VC y E2VN-E1VC y H1 como control negativo. Los controles negativos se llevaron a cabo usando la hélice H1 de Lep frente a E1 y E2. Se establece como 100% de intensidad de fluorescencia el valor de fluorescencia medio de las células transfectadas para la combinación E2VN-E1VC, ya que resulta ser la que presenta una mayor interacción. Las barras de error se obtienen de la realización por triplicado de los ensayos.

En la figura 58 se muestran los resultados obtenidos para los diferentes mutantes, de los cuales ya se había comprobado su capacidad de inserción en bicapas lipídicas. Según se observa, con ninguno de los mutantes de sustitución que anulan de manera simple (K370A y D728A) o doble (K370A-D728A) el puente salino se elimina completamente la señal de fluorescencia, siendo claramente mayor el efecto sufrido cuando la mutación se localiza en la proteína E2. Así, tanto K370A como el mutante doble K370A-D728A interaccionan con una efectividad del 90%. Sin embargo, la introducción de una alanina en posición 728 de E2 reduce la señal de fluorescencia un 55% cuando ésta es la única mutación presente. Este valor es ligeramente mayor que el que se observa cuando E1 interacciona inespecíficamente con la hélice H1. Por otro lado, el doble mutante de intercambio de cargas (K370D-D728K) presenta un nivel de heterodimerización similar al WT (89%). El hecho de que ningún mutante puntual, o combinación de mutantes, bloquee la heterodimerización de los dominios transmembrana de E1 y E2, hace pensar que debe existir otro mecanismo que mantenga la interacción entre ambas regiones de anclaje al eliminar el puente salino.

En cuanto a la carga adicional presente en el segmento transmembrana de E2, la modificación del residuo de arginina en posición 730 no afecta, en líneas generales, a la interacción entre E1 y E2, manteniendo porcentajes de interacción del 82% para R730W y del 74% para R730A y R730K. La excepción se observó en el caso del mutante

R730D en el que la capacidad de interacción disminuye en torno a un 70%, por debajo de los niveles observados cuando la interacción es inespecífica, aunque cabe recordar que este mutante de E2 no se inserta bien en la membrana.

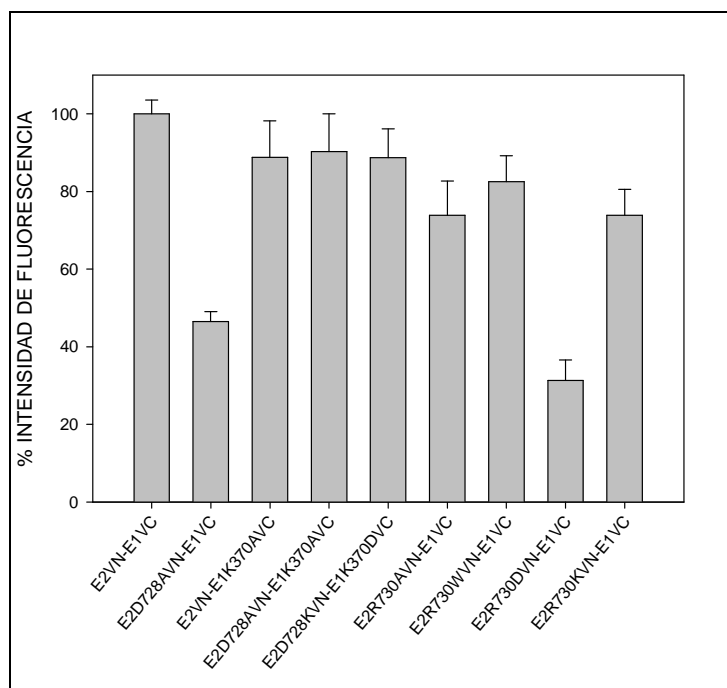


Figura 58. Resultados de citometría para los mutantes de sustitución en los dominios transmembrana de E1 y E2. El porcentaje de la intensidad de fluorescencia registrada con cada uno de los mutantes de sustitución y los mutantes dobles se calcula a partir de los valores de intensidad de fluorescencia considerando el 100% la correspondiente al par E2VN-E1VC. Las barras de error se obtienen de la realización por triplicado del ensayo.

5.2.4. ANÁLISIS DEL MOTIVO DE HETERODIMERIZACIÓN GXXXG EN E1

Como ya se ha comentado, se ha descrito la importancia en la heterodimerización del motivo GXXXG presente entre los residuos 354-358 de E1. Esto ha sido demostrado mediante la inserción de residuos de Trp en varias posiciones de los dominios transmembrana, que han dado como resultado la generación de HCVpp no infectivas cuando se altera dicho dominio [173].

Una vez determinado el comienzo de la hélice transmembrana de E1 en torno al residuo 359-360, se pone en duda que este motivo sea responsable de la heterodimerización. Así, para comprobar su papel, se ha generado un nuevo segmento transmembrana más corto, cuyo primer residuo es la Ile359 y se ha analizado la capacidad de interaccionar con E2 mediante el sistema BiFC.

5.2.4.1. Obtención de los plásmidos recombinantes pBiFC-VC/VN-E1₃₅₉

La clonación del fragmento transmembrana de E1 desde el residuo 359 en los plásmidos pBiFC-VC y VN se llevó a cabo del mismo modo que el resto de las clonaciones en estos plásmidos mediante PCR. Los cebadores utilizados en este caso se describen a continuación mostrándose en azul los nucleótidos que hibridan con la secuencia y subrayadas las dianas de restricción. Los números muestran las posiciones que ocupan dichos aminoácidos en la cadena polipeptídica. El esquema del proceso de clonación es idéntico al mostrado anteriormente en la figura 54.

•BiFCE1₃₅₉-F: 5'- CC GAATTC TG ATA GCG TAT TTC TCC ATG - 3'
EcoRI I₃₅₉ A Y F S M₃₅₈

•BiFCE1-R: 5' - C CGG TAC CTCGAG A CGC GTC GAC GCC GGC AAA - 3'
XhoI A₃₈₃ D V G A F₃₇₈

5.2.4.2. Estudio de la interacción entre los dominios transmembrana E1₃₅₉ y E2

Una vez obtenido el dominio transmembrana acortado y clonado en ambos plásmidos (pBiFC-VN-E1₃₅₉ y pBiFC-VC-E1₃₅₉), se transfectan células HeLa con dichos plásmidos en combinación con el dominio E2 completo clonado en el pBiFC-VC/VN complementario. También se estudia la homodimerización de E1 en presencia y ausencia del motivo GXXXG. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 59.

Según se observa, existe una disminución de la señal de intensidad de fluorescencia de un 17-19% al eliminar el motivo GXXXG de E1 y hacerlo interaccionar con E2, independientemente de en qué plásmido esté clonado cada uno. Así, la interacción del par E2VN-E1VC, considerada como el 100%, disminuye al 83% en ausencia del motivo GXXXG (E2VN-E1₃₅₉VC), mientras que, con el par complementario, E1VN-E2VC, que presenta una intensidad de fluorescencia del 69%, la disminución se produce hasta el 50% al usar la forma acortada de E1 (E1₃₅₉VN-E2VC). Sin embargo, la eliminación del motivo GXXXG de dicha región afecta claramente a la homodimerización de E1 disminuyendo el valor de intensidad de fluorescencia un 50% con respecto al par E1VN-E1VC.

Si la eliminación del motivo GXXXG no anula la heterodimerización y tampoco lo hace la ruptura del puente salino, nos planteamos entonces si es posible que exista un doble mecanismo de heterodimerización para asegurar la formación de heterodímeros funcionales ante mutaciones puntuales y así evitar perder la capacidad infectiva del virus.

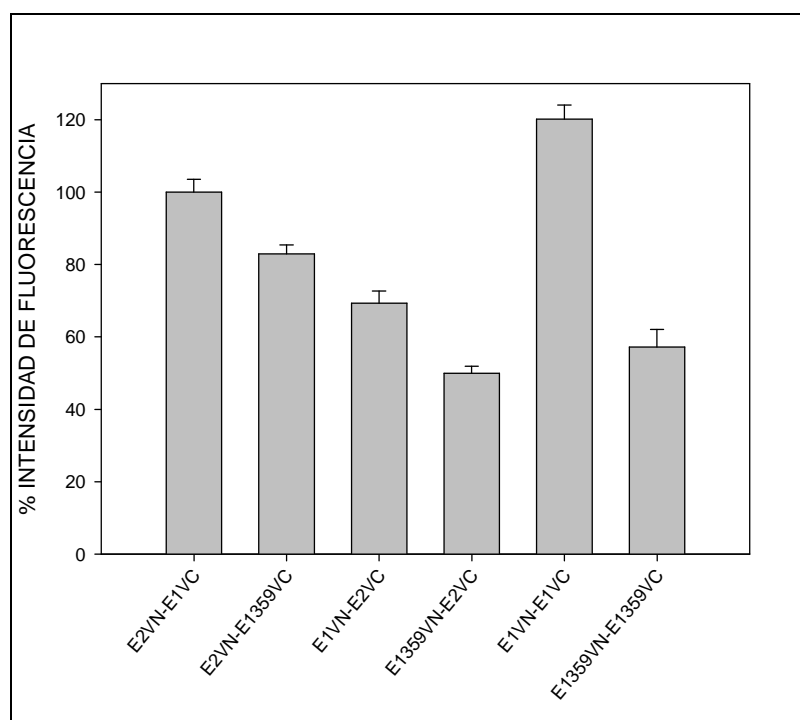


Figura 59. Resultados de citometría para E1₃₅₉. El porcentaje de la intensidad de fluorescencia registrada con cada una de las combinaciones ensayadas se calcula a partir de los valores de intensidad de fluorescencia considerando el 100% la correspondiente al par de proteínas nativas E2VN-E1VC. Las barras de error se obtienen de la realización del ensayo por triplicado.

Para probar esta hipótesis enfrentamos el mutante del puente salino en E2 (D728A) a E1₃₅₉. Si ambos mecanismos de interacción son complementarios, su anulación tiene que suponer la pérdida total de heterodimerización. Como control negativo se utiliza R730A con el fin de asegurar que la sustitución de un residuo cargado en E2 por una alanina no altera la interacción y que las posibles variaciones en ésta serían debidas únicamente a la influencia del motivo GXXXG y del puente salino. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 60.

Según se observa, el efecto de la eliminación de la región 353-358 de E1 conteniendo el motivo GXXXG es igual para todas las formas de E2 probadas, suponiendo en todos los casos una disminución de la capacidad de interacción de en torno a un 12-17%. Así la disminución para el control es del 100% al 83% en ausencia del motivo GXXXG, siendo del 46% al 33% en el caso de D728A y del 74% al 62% al usar E1₃₅₉ frente al control R730A.

Esto nos sugiere que, independientemente del puente salino y del motivo GXXXG, existe algún tipo de interacción hidrofóbica que mantiene unidas a las glicoproteínas E1 y E2 a través de sus dominios transmembrana.

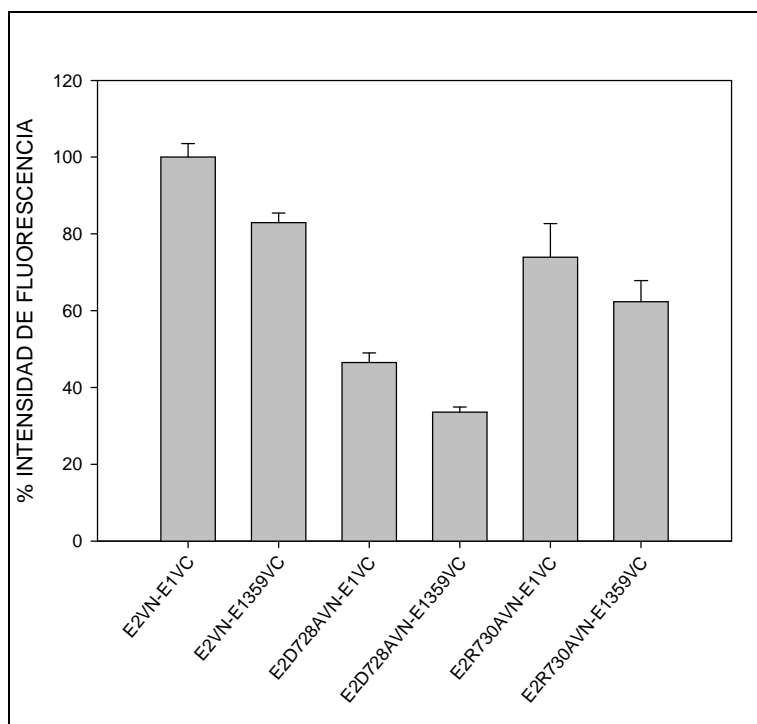


Figura 60. Resultados de citometría para E1₃₅₉ frente al mutante del puente salino D728A. E2WT y E2R730A se usan como controles. El porcentaje de la intensidad de fluorescencia registrada con cada una de las combinaciones ensayadas se calcula a partir de los valores de intensidad de fluorescencia considerando el 100% la correspondiente al par de proteínas nativas E2VN-E1VC. Las barras de error se obtienen de la realización de cada ensayo por triplicado.

Una vez comprobado en los diferentes mutantes que la capacidad de integración se mantiene y la heterodimerización se sigue produciendo a pesar de romper el puente salino y de eliminar el motivo GXXXG, cabe plantearse qué implicación tendrán estos residuos en la formación de heterodímeros funcionales constituidos por las proteínas completas. Para estudiar este aspecto recurrimos al sistema de pseudopartículas HCVpp.

5.2.5. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL: OBTENCIÓN DE HCVpp INFECTIVAS

La generación de pseudopartículas virales, HCVpp, permite la determinación de la capacidad de entrada de las mismas, en las células diana, pudiéndose estudiar cómo afectan a dicho proceso variaciones en las glicoproteínas de la envoltura; en este caso, cómo afectan determinados residuos de las regiones transmembrana a la formación de heterodímeros funcionales en la superficie de las partículas.

5.2.5.1. Obtención de los plásmidos recombinantes pCDNA3.1zeoC₁₃₂E1*E2*

Anteriormente se ha descrito la generación de los mutantes sencillos en el plásmido pCDNA basada el método Quick Change. Los dobles mutantes (E1K370A-E2D728A y E1K370D-E2D728K) se obtuvieron usando como molde el primer mutante de sustitución de E1 para cada caso (K370A y K370D) y como cebadores los pares correspondientes a los mutantes puntuales de E2 (D728A-F/R y D728K-F/R).

Por último, la generación de los triples mutantes (E1K370D-E2D728K-R370W y E1K370D-E2D728K-R370D) se llevó a cabo utilizando como molde el doble mutante E1K370D-E2D728K y como cebadores los mostrados a continuación, que contienen la mutación D728K más la correspondiente al residuo R730. Los nucleótidos marcados en rojo suponen las variaciones incluidas con respecto a la secuencia original. Sólo un aminoácido (R730) es sustituido (**negrita**) en cada caso. Estas modificaciones además eliminan la diana de restricción *Xma*I (subrayada) para facilitar su identificación. Los números representan la posición de los aminoácidos que delimitan el cebador. Los cebadores reversos (R) (no mostrados) son absolutamente complementarios a los directos (F).

- E2D728K-R730D-F: 5'-(725) CTG CTT GCA AAG GCC **GAC** GTC TGC TCC TGC TTG (735)- 3'
D₇₂₈K R₇₃₀D
- E2D728K-R730W-F: 5'-(725) CTG CTT GCA AAG GCC **TGG** GTC TGC TCC TGC TTG (735)- 3'
D₇₂₈K R₇₃₀W

5.2.5.2. Obtención de HCVpp y estudio de su capacidad de entrada

Una vez obtenidos todos los mutantes de sustitución se llevó a cabo la producción de HCVpp en células HEK 293T tal y como se describe en el apartado 4.15 de Materiales y Métodos. Como control negativo se generan pseudopartículas que carecen del genoma de las proteínas estructurales del HCV y que, por lo tanto, son incapaces de infectar células diana. En la figura 61 se observa cómo la expresión de E1 y E2 para todos los mutantes simples ensayados, así como para la doble sustitución de alaninas, es similar a la que se produce para las proteínas nativas (WT). En cuanto a su incorporación en la superficie de las pseudopartículas, se puede ver como todas las proteínas están presentes, en mayor o menor medida, en las HCVpp. Como control negativo se muestra, en ambos casos, la ausencia de E1 y E2 en los carriles correspondientes a las pseudopartículas sin envoltura ya que éstas carecen del cDNA de las glicoproteínas del HCV. Ambas determinaciones han sido llevadas a cabo por

inmunodetección utilizando anticuerpos específicos para E1 y E2, así como para detectar Gag como control de carga.

Cuando se utilizaron las HCVpp mutantes para infectar células de hepatoma Huh7 (figura 62) se comprobó que la ruptura del puente salino, mediante los mutantes simples K370A y D728A así como con el doble mutante K370A-D728A, origina una pérdida total de la capacidad de entrada, obteniéndose valores de 11%, 8% y 5% respectivamente. Por otro lado, la alteración de la capacidad de entrada debida a la sustitución del residuo R730 no es tan acusada. Así, la sustitución de la carga por alanina (R730A) supone una disminución de la entrada de en torno al 57% mientras que la sustitución por triptófano (R730W) sólo reduce la capacidad de entrada en torno a un 18%, causando un efecto similar (25%) la sustitución por lisina (R730K). Estos resultados revelan la preferencia de un residuo de mayor tamaño que la alanina en la posición 730, aunque no parece ser crucial la presencia de la carga.

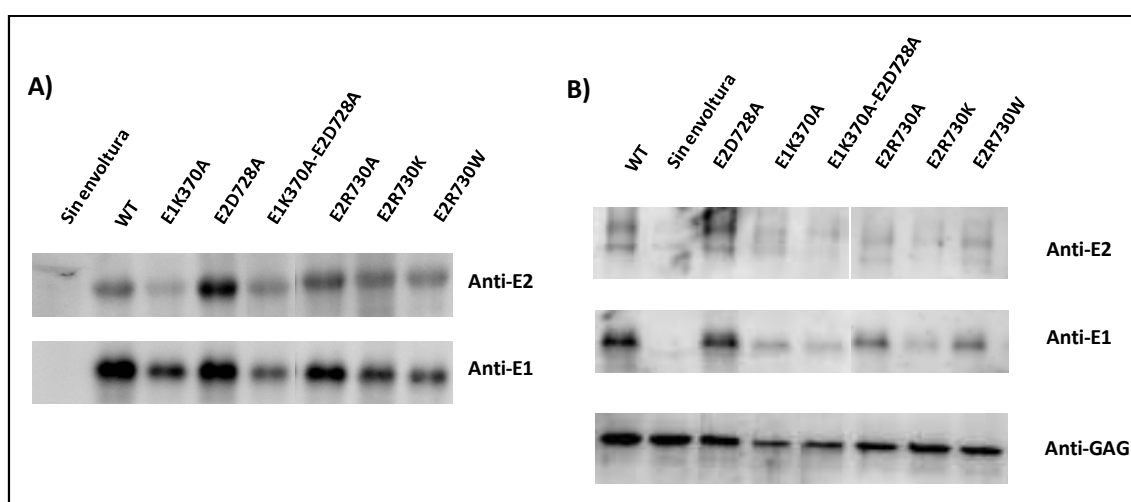


Figura 61. Inmunodetección de las glicoproteínas E1 y E2 nativas y mutantes presentes en el lisado de las células HEK 293T transfectadas (A) y en las HCVpp purificadas (B). Para detectar E2 se ha usado una mezcla de anticuerpos monoclonales, AP33 y ALP198. Para detectar E1 se empleó el anticuerpo monoclonal A4. La proteína Gag de las pseudopartículas fue detectada empleando un anticuerpo policlonal de rata, CRL1912.

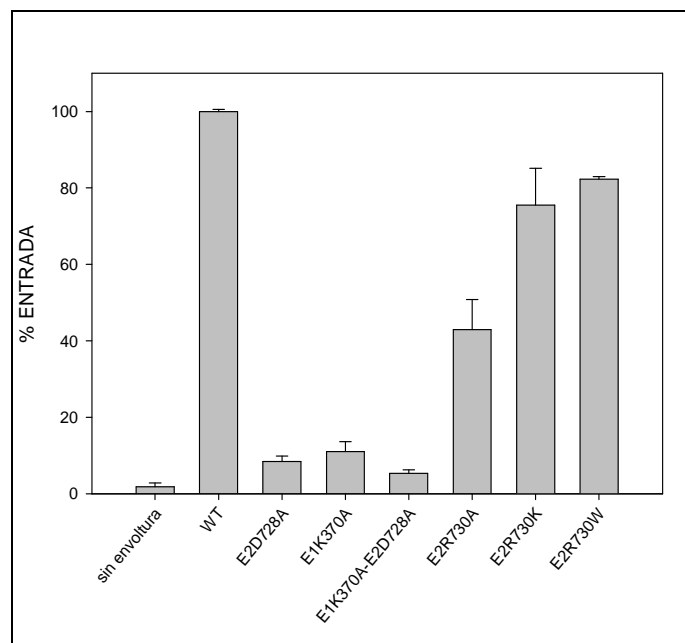


Figura 62. Infección de células Huh7 con HCVpp C₁₃₂E1E2 (H77) y los mutantes de sustitución. El ensayo se realizó en una placa de 24 pocillos, infectando con 150 μ l de HCVpp/pocillo durante 3 h a 37 °C. Cada medida se realiza por triplicado. Las RLUs (unidades relativas de luminiscencia) han sido medidas tras tres días de infección a 37 °C. Las barras de error han sido calculadas con los datos de, al menos, tres experimentos independientes. El 100% de entrada se ha establecido para las RLUs correspondientes a la construcción no modificada C₁₃₂E1E2 correspondiente al genotipo 1a de la cepa H77 (WT).

Estudios de entrada en Huh7 de HCVpp mutantes con el puente salino permutado

Una vez comprobada la necesidad de la existencia del puente salino entre los dominios transmembrana de E1 y E2 para obtener HCVpp funcionales, se planteó analizar más exhaustivamente, la importancia de esta interacción iónica. Con el fin de recuperar la infectividad mediante la restauración del puente salino, se estudió la capacidad de entrada de la combinación K370D-D728K en la cual se invierten las cargas entre los residuos implicados de ambos dominios transmembrana. En esta nueva situación se podría pensar que el residuo 370 de E1, ahora ocupado con un Asp, tienda a interaccionar preferentemente con la Arg730 cargada positivamente en E2, en lugar de con el residuo 728 (ahora también con carga positiva al haber sido sustituido por una Lys). Por ello, contemplando esta posibilidad, se usó el doble mutante D728K-R730W en combinación con K370D; de este modo, la única carga presente en E2 sería la correspondiente al residuo 728. Del mismo modo, y simplemente como control, se utilizó el mutante D728K-R730D en combinación con K370D para evaluar la necesidad de un balance de cargas cero en E2.

Al igual que en los estudios anteriores, la producción de las proteínas E1 y E2 en cada uno de estos tres nuevos mutantes, así como su capacidad para integrarse en las

partículas generadas, se determinó por inmunodetección. Los geles mostrados en la figura 63 revelan que, en todos los casos, E1 y E2 se producen en niveles similares al WT (C₁₃₂E1E2). En cuanto a la incorporación de las proteínas a las partículas, podemos decir que en todos los casos, éstas también se incorporan de un modo similar.

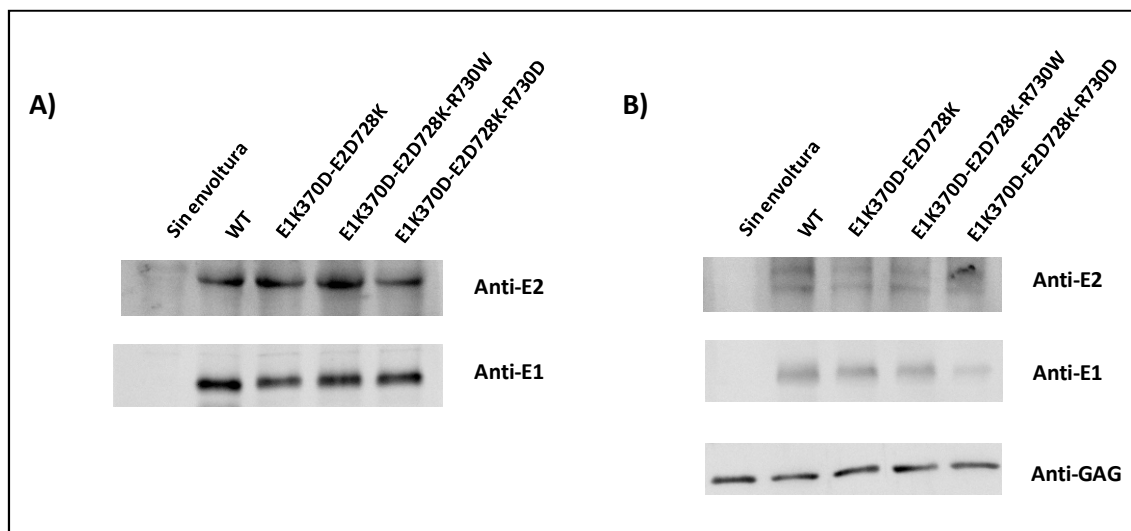


Figura 63. Inmunodetección de las glicoproteínas E1 y E2 nativas y mutantes presentes en el lisado de las células HEK 293T transfectadas (A) y en las HCVpp purificadas (B). Para detectar E2 se ha usado una mezcla de anticuerpos monoclonales, AP33 y ALP198. Para detectar E1 se empleó el anticuerpo monoclonal A4. La proteína Gag de las pseudopartículas fue detectada empleando un anticuerpo policlonal de rata, CRL1912.

Los resultados de la capacidad de entrada de los tres mutantes en células Huh7 se muestran en la figura 64. Según se observa, la simple permutación del puente salino (mutante K370D-D728K), da lugar a partículas con una infectividad casi nula (2.7%). Esto indica que si el puente salino se recupera, no lo hace manteniendo la misma orientación de los segmentos transmembrana, lo cual alteraría la disposición de los ectodominios, variando su estructura tridimensional y afectando a su capacidad de reconocer los receptores o de mediar la fusión.

Sin embargo, el bloqueo de la carga presente en la posición 730 de E2 introduciendo en su lugar un Trp (mutante E1K370D-E2D728K-R730W), que permitiría la formación del puente salino entre los residuos 370 de E1 y 728 de E2, da lugar a la recuperación parcial de la capacidad infectiva hasta un 31%. Por otro lado, el balance de cargas cero en E2 no parece ser importante y, de hecho, la presencia de una carga negativa libre en E2 (mutante E1K370D-E2D728K-R730D) no sólo afecta a la inserción sino que anula la capacidad de formación de heterodímeros funcionales (figura 64).

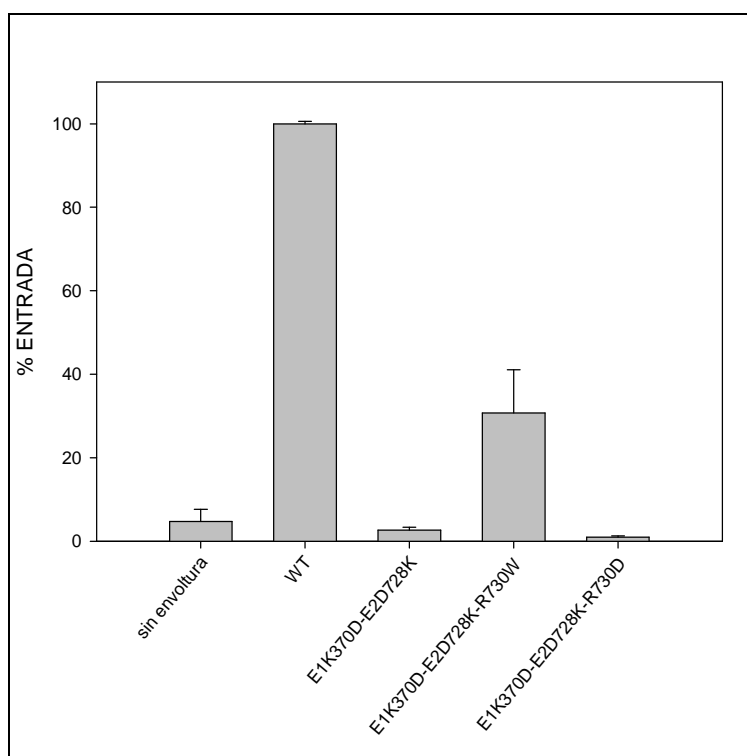
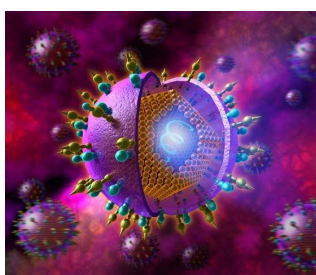


Figura 64. Infección de células Huh7 con HCVpp C₁₃₂E1E2 (H77) y los dobles mutantes de sustitución. El ensayo se realizó en una placa de 24 pocillos, infectando con 150 μ l de HCVpp/pocillo durante 3 h a 37 °C. Cada medida se realiza por triplicado. Las RLUs han sido medidas tras tres días de infección a 37 °C. Las barras de error han sido calculadas con los datos de tres o más experimentos independientes. El 100% de entrada se ha establecido para las RLUs correspondientes a la construcción no modificada C₁₃₂E1E2 correspondiente al genotipo 1a de la cepa H77 (WT).

Parece claro que, en todos los casos estudiados, las partículas que se producen incorporan las proteínas E1 y E2 a su superficie. Por ello, las variaciones en la capacidad de entrada de pseudopartículas virales en células diana de hepatoma mostradas por los diferentes mutantes, deben ser consecuencia de alteraciones conformacionales en el plegamiento de E1 y E2 derivadas de variaciones en la correcta heterodimerización. Lo que no podemos saber, es cómo se ha alterado su disposición ni la interacción entre ellas, sino tan sólo qué residuos resultan cruciales para mantener la formación de heterodímeros funcionales y con capacidad de mediar la entrada en las células diana.



DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

6.1. IMPLICACIÓN DEL SUPUESTO PÉPTIDO FUSOGÉNICO 268-292 DE E1 EN LAS PROPIEDADES DEL COMPLEJO E1-E2

El virus de la hepatitis C es el principal causante de cirrosis y cáncer hepático. Desde hace varios años, los esfuerzos para desarrollar una vacuna efectiva frente a este virus están siendo considerables, ya que los tratamientos contra la hepatitis C son altamente costosos y en ocasiones poco efectivos. Los principales estudios se basan en la caracterización de las glicoproteínas presentes en su envoltura lipídica, y que son las encargadas del reconocimiento de los receptores celulares y de mediar el proceso de fusión [152, 219, 223, 281]. Sin embargo, todavía no se han determinado de manera clara los mecanismos moleculares que tienen lugar durante la fusión, ni tampoco la localización de los péptidos fusogénicos de las proteínas implicadas en este proceso.

El bloqueo del proceso de entrada del HCV constituiría la diana ideal contra la hepatitis C, puesto que conllevaría la supresión de la infectividad, de la replicación y de la citotoxicidad inducida por los contactos virus-célula, siendo un mecanismo óptimo de vacunación. Así, la caracterización estructural de las proteínas de la envoltura, o bien, de fragmentos de éstas importantes en el proceso fusogénico, sería de gran ayuda.

Pese a que no existen estudios que confirmen que E2 sea la proteína de fusión del HCV, las analogías observadas en la organización de los genes que codifican las proteínas de la envoltura con otros virus de clase II (como flavivirus y alfavirus), sugieren que la proteína de fusión es la segunda glicoproteína en la poliproteína precursora y que muestra un plegamiento de tipo II. Una de las características de esta familia es su plegamiento como un heterodímero con la proteína que la precede en la poliproteína precursora que actúa como chaperona para el plegamiento de la segunda. Además, tanto la proteína E de flavivirus como la proteína E1 de alfavirus, cuyas estructuras tridimensionales son conocidas, muestran el mismo plegamiento a pesar de que sus secuencias no están conservadas, lo que sugiere que los genes que las codifican proceden de un ancestro común [353]. El ectodominio de la glicoproteína E2 del HCV y de los pestivirus tiene un tamaño en torno a 100 aminoácidos menor que el de flavivirus y alfavirus, lo cual indica que, si consideramos que E2 es una proteína de fusión de tipo II, su ectodominio debe estar truncado. Se ha propuesto un modelo para la estructura terciaria de E2 basado en la formación de puentes disulfuro que permitiría que la proteína, a pesar de ser más pequeña de lo esperado, adquiriera la

estructura necesaria para comportarse como una proteína de fusión de clase II y para reconocer a los receptores celulares [153] (figura 8, página 34).

La controversia sobre la identidad de la proteína fusogénica apareció en el año 1999, cuando se describió la presencia de un tramo potencialmente fusogénico por su hidrofobicidad en E1 [352], aunque no se dio ninguna evidencia experimental sobre ello. Sin embargo, esto promovió la definición de E1 también como una molécula de tipo II truncada [354]. Otros autores han identificado diferentes zonas de E1 y E2 que podrían estar implicadas en la fusión virus-célula hospedadora. Así, se ha propuesto la región 270-284 [283], 265-296 [284] o 262-290 [355] de E1 y las regiones 416-430 y 600-620 de E2 [283] como posibles péptidos fusogénicos. Por lo tanto, no parece muy claro cuál de las dos glicoproteínas es la implicada en el proceso de fusión ni el mecanismo a través del cual se produce.

Una de las aproximaciones utilizadas para determinar las regiones de una proteína susceptibles de actuar como péptidos de fusión consiste en el empleo de la escala de hidrofobicidad interfacial de Wimley y White. Esta escala se basa en la energía libre de transferencia de cada aminoácido para pasar de un medio acuoso a la interfase de la membrana lipídica [356]. A diferencia de otras escalas, como la de hidropatía de Kyte y Doolittle [357], la de hidrofobicidad interfacial tiene en cuenta la contribución del enlace peptídico además de la de las cadenas laterales. Además, es aditiva y refleja medidas termodinámicas reales, lo que permite su empleo para evaluar la capacidad de determinadas secuencias para interaccionar con las interfases de las membranas. Esto contribuiría a la desestabilización necesaria de las bicapas para que tenga lugar el proceso de fusión.

Con base en estos perfiles, hemos definido tres regiones en E2 comprendidas entre los residuos 430-449, 543-560 y 603-624 y se ha comprobado que poseen capacidad fusogénica [153, 281]. Utilizando la misma escala, se han definido dos regiones con elevados índices de hidrofobicidad para E1. La primera de ellas corresponde a una amplia zona con valores positivos de hidropatía, situada entre los residuos 268 y 292, lo que la define como susceptible de presentar propiedades fusogénicas (figura 65). La segunda, presente en la región carboxilo terminal, corresponde al dominio transmembrana responsable del anclaje de la proteína a la bicapa lipídica (residuos 340-383).

Estudios previos de desestabilización de sistemas modelo de membrana llevados a cabo con el péptido sintético 265-296 aislado, muy similar al propuesto en este trabajo basado en el perfil de hidropatía, han revelado que se comporta como un péptido fusogénico y que presenta todas las propiedades físico-químicas necesarias para desempeñar dicha función [285]. Sin embargo, estos estudios se realizaron en un

entorno muy diferente al que presenta el péptido en el contexto del ectodominio de E1. Por otro lado, en estudios llevados a cabo con el sistema de HCVpp se ha comprobado que diversas mutaciones puntuales en esta región (C272A, C281A, G282A, G288A [358] y F285A [359]), afectan en mayor o menor medida a la capacidad de entrada de las pseudopartículas en células Huh7. En este trabajo se ha propuesto estudiar el supuesto péptido fusogénico, no de forma aislada como péptido sintético, ni con mutantes puntuales a lo largo de su secuencia, sino delecionándolo por completo y estudiando las posibles alteraciones de la capacidad fusogénica en presencia de E2 y del resto de la proteína E1 tanto en la quimera E2E1 como en pseudopartículas virales.

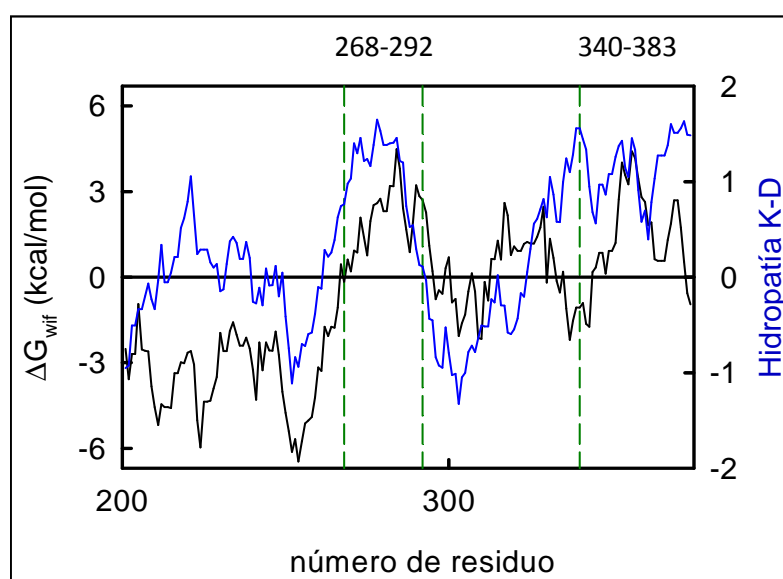


Figura 65. Perfiles de hidrofobicidad interfacial e hidropatía de la proteína E1 del HCV. El perfil de hidrofobicidad interfacial (negro) se ha calculado según la escala de Wimley y White (1996) y el de hidropatía (azul) usando la escala de Kyte y Doolittle (1982). En la parte superior se muestran los residuos que delimitan las regiones hidrofóbicas, siendo la primera la correspondiente al supuesto péptido fusogénico y la segunda al dominio transmembrana.

En primer lugar, se ha partido de la proteína quimérica E2E1 compuesta por los ectodominios de ambas proteínas. Según se ha descrito anteriormente, tanto la proteína E1E2 como la quimera con los dominios permutados E2E1 se comportan como polipéptidos plegados y presentan propiedades estructurales y antigénicas así como de desestabilización de sistemas modelo de membrana prácticamente idénticas [346]. Sin embargo, el rendimiento sensiblemente superior en la producción de E2E1 es el motivo por el cual se ha utilizado la quimera con los ectodominios permutados como molde para la producción del mutante de delección del péptido 268-292.

Así, la expresión y purificación de la proteína quimérica E2E1 $_{\Delta 268-292}$, que carece del presunto péptido fusogénico descrito para E1, fue llevada a cabo en el sistema de expresión de *baculovirus* de la misma forma que se había hecho para E2E1. La proteína presenta una secuencia de 6 His en el extremo amino terminal con el fin de facilitar su purificación. Se observó una elevada secreción de proteína al medio extracelular en los cultivos de células de insecto. Dicha proteína se purificó en condiciones nativas mediante cromatografía de afinidad en un único paso, obteniéndose un elevado rendimiento, 10.7 mg de proteína por litro de cultivo. El análisis de la misma por electroforesis reveló que la masa molecular observada resultó ser un 25% superior a la teórica, debido a la presencia de glicosilaciones.

La obtención del mutante de delección con un elevado grado de pureza y en gran cantidad, ha permitido realizar su caracterización tanto estructural como funcional en cuanto a su capacidad para desestabilizar sistemas modelo de membrana.

La eliminación de la posible región fusogénica de E1 podría tener consecuencias en el correcto plegamiento de la proteína. Por ello, se llevó a cabo la caracterización estructural de la misma tomando como referencia la proteína E2E1.

La caracterización espectroscópica del mutante de delección mediante dicroísmo circular en el ultravioleta lejano indica que se trata de una proteína con un alto porcentaje de estructura no ordenada (41%), siendo la estructura ordenada mayoritaria la de tipo extendido (45%), y conteniendo un bajo porcentaje de estructura en hélice α (14%), como es característico de las proteínas de fusión tipo II. Estos porcentajes se calcularon a partir de los espectros de dicroísmo utilizando el método CCA (*Convex Constraint Analysis*) [339] y resultaron ser similares a los porcentajes teóricos obtenidos mediante el método GOR IV de Garnier [338] y a los obtenidos con E2E1, lo que pone de manifiesto que la estructura secundaria del mutante no ha sufrido apenas modificaciones al eliminar la posible región fusogénica. Por otro lado, los espectros de emisión de fluorescencia presentan un máximo en torno a 333 nm lo cual indica que se trata de una proteína en la que los residuos de Trp se localizan en un entorno relativamente apolar. La comparación de estos espectros con los obtenidos para la proteína quimérica E2E1 indica que sus propiedades estructurales, monitorizadas por espectroscopía de fluorescencia, son muy similares a las de la proteína que contiene los ectodominios completos.

Cuando se analizó el estado de oligomerización de la proteína mutante mediante PAGE-SDS, se observó que, en condiciones reductoras, migra como una única banda correspondiente a la forma monomérica, mientras que en condiciones no reductoras se diferencian bandas de mayor tamaño que corresponden a los diversos

estados de oligomerización que puede adoptar la proteína. Un patrón idéntico se obtiene para la proteína de control E2E1 lo que lleva a afirmar que la delección del supuesto péptido fusogénico de E1 no altera las propiedades de asociación de la proteína. Igualmente, ambas proteínas son reconocidas de modo similar por anticuerpos frente a E1, E2 y la extensión de histidinas que ambas portan en su extremo N-terminal.

Por otro lado, ambas proteínas son reconocidas por anticuerpos presentes en el suero de pacientes infectados por el HCV. En ocasiones se observó que el reconocimiento del mutante era ligeramente mayor, debido, posiblemente, a una mayor exposición de alguno de los epítomos o por cambios locales que hayan podido afectar a la conformación de los mismos. El enzoinmunoensayo con el anticuerpo conformacional H53, que reconoce a la proteína E2 del HCV cuando está correctamente plegada [164], permitió comprobar que el plegamiento de las proteínas era el adecuado, al menos en las regiones reconocidas por el anticuerpo monoclonal. Además, ambas proteínas fueron reconocidas de igual manera por el anticuerpo conformacional.

En conclusión, el mutante de delección, E2E1_{Δ268-292}, no presenta variaciones en la estructura secundaria ni terciaria con respecto a E2E1, por lo que se puede estudiar sus propiedades fisicoquímicas y determinar la implicación de la región 268-292 de E1 en el proceso de fusión en un entorno más similar al fisiológico.

Para estudiar la implicación de la región delecionada en la fusión de las membranas viral y celular, se llevaron a cabo distintos estudios de interacción y desestabilización de bicapas utilizando sistemas modelo de membrana. Concretamente se emplearon vesículas de fosfolípidos ácidos, dada la baja capacidad que presentan las quimeras con los dos ectodominios de interaccionar con fosfolípidos neutros [161, 286, 346].

Los resultados obtenidos indican que el mutante de delección es capaz de interaccionar con vesículas de PG, provocando la agregación de las mismas de una manera dependiente de la concentración de proteína, tal y como se deduce del aumento de la densidad óptica a 360 nm, siendo este efecto más acusado a pH 5.0 que a pH 7.0. Los resultados que se obtuvieron a pH 7.0 muestran que se forman agregados de menor tamaño a juzgar por los menores valores de absorbancia observados. En cambio, a pH 5.0, los resultados muestran una elevada capacidad de inducir la agregación de vesículas. Los resultados obtenidos para ambos pH son comparables a los obtenidos para la quimera con los ectodominios completos E2E1 de modo que la ausencia de la región descrita como fusogénica para E1 no parece alterar la capacidad de la proteína para inducir agregación de vesículas lipídicas.

En cuanto a los ensayos de mezcla de lípidos, los resultados indican que los agregados de vesículas de PG inducidos por ambas proteínas acaban fusionando completamente a pH 5.0. De nuevo, la ausencia del supuesto péptido fusogénico de E1 no altera la capacidad de la proteína de inducir la mezcla de lípidos en las vesículas estudiadas, no siendo por tanto un componente clave en el proceso de fusión en las etapas iniciales.

Por otro lado, los ensayos de liberación de contenidos acuosos de vesículas de PG para E2E1 y para E2E1 $_{\Delta 268-292}$ muestran que, aunque a pH ácido con ambas proteínas se alcanza el mismo nivel de lisis, se requiere una concentración de E2E1 mucho menor, ya que a una relación P/L de $0.25 \cdot 10^{-3}$, E2E1 es capaz de alcanzar un 80% de liberación de contenidos acuosos, mientras que E2E1 $_{\Delta 268-292}$ no lo alcanza hasta una concentración de proteína 10 veces mayor, a una relación P/L de $2.5 \cdot 10^{-3}$, alcanzando el 100% a una relación P/L de $10 \cdot 10^{-3}$. Esta concentración tan alta de proteína no parece estar presente en la superficie del virus, por lo que cabe esperar que este proceso no se produzca en condiciones fisiológicas. Este hecho evidencia que, de algún modo, la región delecionada de E1 tiene una participación en la capacidad de la proteína para desestabilizar la membrana de las vesículas.

De los tres estudios de desestabilización de vesículas lipídicas llevados a cabo (agregación, mezcla de lípidos y liberación de contenidos acuosos), se puede deducir que la región 268-292 no está implicada en las primeras etapas de unión y desestabilización de las membranas ya que no se altera la capacidad del mutante de deleción de inducir agregación y mezcla de lípidos, pero si tiene alguna implicación en la formación de poros en la membrana. Por ello, podría modular la última etapa de la fusión de las membranas viral y celular.

Una vez constatada la participación de la región 268-292 en etapas tardías del proceso de fusión se ha comprobado su relevancia utilizando un sistema modelo de estudio de entrada viral, las HCVpp. En este sistema se han generado pseudopartículas virales que expresan en su superficie E1 y E2, tanto completas (C₁₃₂E1E2) como mutantes eliminando la región fusogénica de E1 (C₁₃₂E1 $_{\Delta 268-292}$ E2). La evaluación de los niveles de expresión de ambas proteínas en las dos construcciones revela que su producción es adecuada y se encuentran en niveles similares. La incorporación de las proteínas a la superficie de las partículas también se produce adecuadamente, tanto para las proteínas nativas como para las correspondientes al mutante de deleción. Sin embargo, el estudio de la entrada de las HCVpp en las células Huh7 revela una disminución de la capacidad de entrada de un 95% con respecto a las HCVpp con la proteína completa, lo cual sugiere que la eliminación del péptido fusogénico de E1 es crucial para mediar la fusión con las células diana.

Esta disminución de la capacidad de entrada se relaciona con la capacidad reducida de la quimera delecionada E2E1_{Δ268-292} para distorsionar la membrana como revela el ensayo de liberación de contenidos acuosos. De hecho, se ha descrito que el proceso de fusión conlleva diferentes etapas: acercamiento de las membranas lo cual desestabiliza la interfase, formación del intermedio de hemifusión donde se produce la mezcla de lípidos y finalmente la formación de poros y el colapso total de las membranas [360]. Si la proteína mutante no es capaz de formar poros en la membrana no será capaz de mediar la fusión y por lo tanto las pseudopartículas generadas no tendrán la capacidad de entrar en las células diana.

Aunque se ha propuesto la implicación de residuos puntuales de la región 264-290 en la capacidad fusogénica de E1 [358, 359], nuestros datos permiten postular la importancia en su conjunto de la región 268-292 de E1 en la fusión, considerándose como un péptido fusogénico que interviene en las etapas finales de dicho proceso siendo crítico para mediar la entrada del virus en la célula diana donde liberará su material genético.

Sin embargo, no hay que olvidar que no es el único responsable de esta etapa del ciclo viral ya que su eliminación no altera los procesos de agregación ni de mezcla de lípidos. Debe haber, por lo tanto, otras regiones en las glicoproteínas de la envoltura del HCV implicadas en las primeras etapas del proceso de fusión. Será por ello, un conjunto de regiones las que, en diferentes estadios, medien la fusión entre las membranas viral y celular. No es la primera vez que se propone la actuación conjunta de varias regiones en el proceso de fusión. En el caso del HCV, en estudios previos se ha descrito la posible implicación de varias regiones de E1 y E2 en la fusión de las membranas, estando implicadas dichas regiones directa o indirectamente en este proceso [283, 347, 361]. También en otros virus con envoltura se ha descrito la actuación conjunta de varias regiones de la proteína fusogénica en la fusión de las membranas [362].

6.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS DOMINIOS TRANSMEMBRANA DE LAS GLICOPROTEÍNAS DE LA ENVOLTURA E1 Y E2

Uno de los aspectos clave en el estudio de las proteínas de la envoltura del virus de la hepatitis C es determinar cuáles son las interacciones necesarias para la formación de un heterodímero E1-E2 funcional estable, que permita al virus reconocer los receptores y fusionarse con las células diana. Teniendo en cuenta los datos que existen sobre la implicación de los dominios transmembrana (TMD) en retener a las proteínas en el retículo [167], así como en la correcta formación de heterodímeros funcionales [165, 167], nos hemos propuesto analizar las bases moleculares tanto de la integración de los dominios hidrofóbicos de E1 y E2 en la membrana como de su interacción para dar lugar a estos complejos.

Para ello, nos hemos basado en el uso de tres técnicas que, tanto *in vitro* como *in vivo*, nos han permitido estudiar diferentes aspectos de los segmentos de anclaje a la membrana de las glicoproteínas de la envoltura del HCV:

1. En primer lugar, hemos estudiado la capacidad de inserción de los dominios transmembrana mediante el sistema de traducción-glicosilación *in vitro*, clonando la región de interés en el seno de la proteína *Leader peptidase* (Lep) y usando microsomas como sistema de membranas. La obtención de proteína mono o doblemente glicosilada, en función de la posición relativa con respecto a la bicapa de las dianas de glicosilación presentes, nos ha permitido determinar que los TMD de E1 y E2 se insertan correctamente en la membrana.

2. A continuación, se ha empleado el sistema BiFC de reconstitución de la proteína verde fluorescente Venus que ha permitido determinar, *in vivo*, la capacidad de los TMD de E1 y E2 de interaccionar en la membrana del retículo endoplásmico donde son retenidos, según se ha demostrado por microscopía confocal. Además, el uso de la hélice I (HI) de Lep como control negativo, nos permitió asegurar que no existe señal basal debida a la probabilidad de encontrarse en la membrana dos segmentos que, sin interaccionar, y tan sólo por proximidad, pudieran dar lugar a la reconstitución de Venus.

3. Por último, la utilización de pseudopartículas virales (HCVpp), producidas en células HEK 293T, nos ha posibilitado el estudio, *in vivo*, de la capacidad de entrada de las glicoproteínas completas de la envoltura, E1 y E2, en las células diana Huh7. Como control negativo de este proceso se generaron partículas carentes del genoma de las proteínas estructurales del HCV (C, E1 y E2), incapaces por tanto, de infectar células diana.

La puesta a punto de estas técnicas, desarrolladas convenientemente para los dominios transmembrana nativos de E1 y E2, ha sido la clave para analizar a qué nivel (integración, heterodimerización o funcionalidad) afecta la sustitución o la eliminación de determinados residuos en las regiones de anclaje a la membrana de las glicoproteínas de la envoltura del HCV.

Puente salino

En el año 2005 se observó, mediante mutantes puntuales de E2, la posible implicación del residuo D728 en la formación de una interacción electrostática con E1 que estabilizara la heterodimerización, permitiendo la entrada de pseudopartículas generadas en células de hepatoma [363]. Posteriormente, mediante modelaje informático, se postuló la formación de un puente salino entre los residuos K370 de E1 y D728 de E2 [174] que explicaría la presencia de dichas cargas en la región central de la hélice transmembrana única descrita hasta ese momento [121, 165] (figura 66). El primer objetivo de este estudio fue, por tanto, tratar de arrojar luz sobre la posible implicación del puente salino en la formación de heterodímeros funcionales.

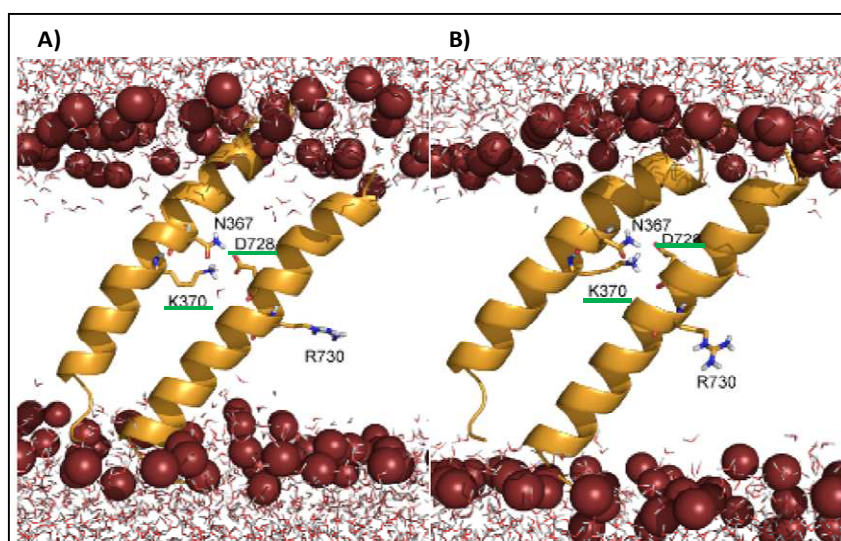


Figura 66. Estructura del heterodímero E1-E2 a nivel transmembrana. Se muestran las capturas finales tras 100 ns de dos planos (A y B) de simulación por dinámica molecular (MD). Los residuos conservados Asn₃₆₇, Lys₃₇₀, Asp₇₂₈ y Arg₇₃₀ se muestran con su estructura. Los residuos implicados en la formación del puente salino aparecen subrayados en verde. Las cadenas hidrofóbicas de los lípidos no se muestran para simplificar. Adaptada de [174].

Para ello se anuló dicha interacción mediante la sustitución de ambos residuos por alaninas (K370A y D728A), de manera independiente y conjunta. Los resultados obtenidos usando el sistema de traducción-glicosilación *in vitro*, muestran que los dos

dominios transmembrana mutados son capaces de integrarse en las bicapas lipídicas con una eficacia superior al 95% respecto a los dominios transmembrana nativos.

Una vez comprobada la capacidad de integración de estos dominios transmembrana independientemente de las sustituciones realizadas, se procedió a estudiar su interacción *in vivo* usando para tal fin el sistema BiFC. Los resultados obtenidos mostraron que la sustitución de los residuos implicados en el puente salino por alaninas no afecta de igual manera en ambos dominios. La sustitución en E1 (K370A) no altera notablemente la capacidad de interacción con E2; sin embargo, el mutante D728A en E2 da lugar a una disminución de la interacción con E1 en torno al 54%, alcanzando un nivel ligeramente superior al que corresponde a la interacción inespecífica de E1 con HI, recuperándose la interacción con el mutante doble K370A-D728A. Estudios previos de modelaje molecular habían descrito este hecho alegando que, en presencia de la mutación K370A, ante la imposibilidad de formar el puente salino, el D728 es capaz de establecer contactos estables con R730, dirigiendo a este residuo hacia la interfaz hélice-hélice y haciéndolo interaccionar con la N367, formando un puente de hidrógeno que estabilizaría la interacción heterodimérica. Esto no ocurriría, sin embargo, si la mutación introducida es D728A, rompiéndose el puente salino y no produciéndose rotación [174] (figura 67).

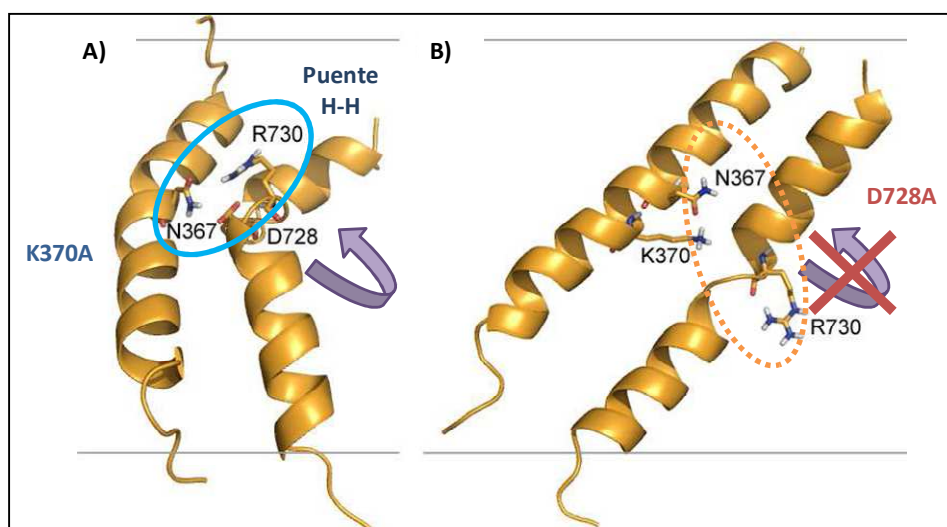


Figura 67. Estructura de los mutantes A) K370A y B) D728A. Se muestran las situaciones finales de las simulaciones obtenidas mediante dinámica molecular. A) El mutante K370A permite al residuo D728 provocar un giro que enfrente a R730 con N367 formando un puente de hidrógeno que estabiliza el heterodímero. B) El mutante D728A impide el giro de la hélice transmembrana de E2 rompiendo totalmente cualquier tipo de estabilización del heterodímero a nivel electrostático dirigido. Adaptada de [174].

Esto no explica, sin embargo, el hecho de que se recupere la interacción con la doble sustitución por alaninas (K370A-D728A). Por lo tanto, la recuperación podría

deberse a algún tipo de interacción hidrofóbica que se vea favorecida por la presencia de los nuevos residuos. En definitiva, la pérdida del puente salino tiene un efecto diferente en ambos residuos. Cuando se elimina en el mutante D728A, el residuo cargado K370 de E1 ocupa una localización no favorable que hace que se pierda casi completamente la componente específica de la interacción. Sin embargo, cuando el puente se elimina en el mutante K370A, el residuo D728 de E2 establece nuevas interacciones con los residuos próximos, lo que hace que la interacción E1-E2 no se vea modificada.

Por otro lado, se ha estudiado el doble mutante K370D-D728K, en el cual se mantienen las mismas posiciones cargadas pero con los residuos intercambiados entre ambos dominios transmembrana, manteniéndose, por tanto, el supuesto puente salino. Ambos segmentos se integran con una eficacia superior al 95% en las bicapas lipídicas y son capaces de interaccionar específicamente en el sistema BiFC. También, en el caso del doble mutante K370A-D728A, en el cual se elimina la posibilidad de la interacción electrostática, se produce la inserción de ambos segmentos en la membrana así como la interacción específica. Este hecho pone en duda la importancia del puente salino en la formación de heterodímeros entre ambos dominios hidrofóbicos. Teóricamente, si la formación de heterodímeros E1-E2 fuera debida únicamente a la formación de un puente salino entre los residuos K370 de E1 y D728 de E2, la sustitución de estos residuos por alaninas debería reducir drásticamente la capacidad de interacción, recuperándose ésta al introducir las cargas, aunque sea intercambiadas. Por lo tanto, el establecimiento de un puente salino no es determinante para la heterodimerización de las regiones transmembrana de E1 y E2.

Sin embargo, el uso de pseudopartículas virales (HCVpp) con las glicoproteínas de la envoltura E1 y E2 completas, que permite determinar la influencia de dichas mutaciones en la capacidad de entrada del virus en las células diana, revela que todas las mutaciones en las que se afecta la formación del puente salino, provocan una drástica pérdida de la capacidad de entrada de las pseudopartículas, quedando ésta en niveles inferiores al 10%. Esto es debido a que disponemos de las glicoproteínas completas y no sólo de los dominios transmembrana; por ello las variaciones en el modo de interacción de los segmentos de anclaje pueden traducirse en cambios importantes en la interacción entre los ectodominios. Según estos resultados, el puente salino no parece ser crucial en el mantenimiento de la interacción entre las regiones de anclaje pero es indispensable para que se produzca del modo correcto y que conduzca a la formación de heterodímeros funcionales.

Por otro lado, el intercambio de las cargas entre ambos dominios transmembrana (K370D-D728K) con el objeto de mantener el puente salino, da lugar a una interacción de las regiones de anclaje de E1 y E2 que hace que las HCVpp

resultantes pierdan totalmente la capacidad de entrada en las células diana. Una posible hipótesis para justificar este hecho sería la presencia, en este mutante, de dos residuos cargados positivamente en E2 muy próximos, D728K y R730. Puede ser que el segundo forme un puente salino con E1K370D, impidiendo la interacción de E1 con el residuo mutado D728K y, por tanto, la reconstitución del puente salino natural. Estos residuos están separados dos posiciones, lo cual supondría un giro obligado de 200° de la región transmembrana de E2, alterando la interacción específica entre los ectodominios y anulando, por tanto, la capacidad de entrada (figura 68). Para estudiar esta hipótesis, se eliminó la carga positiva en la posición 730 de E2 sustituyéndola por Trp, ya que se ha comprobado que esta única sustitución no altera notablemente ni la inserción, ni la interacción, ni la formación de pseudopartículas infectivas. Por otro lado, y teniendo en cuenta que en condiciones nativas E2 tiene dos cargas de signo contrario, D728 y R730, separadas 200° , también se puede argumentar que este balance de cargas neutro en E2 sea un requisito necesario para su estabilidad. Por ello, también se diseñó el mutante en el que se sustituye el residuo 730 por Asp, para mantener el balance de cargas neutro con D728K.

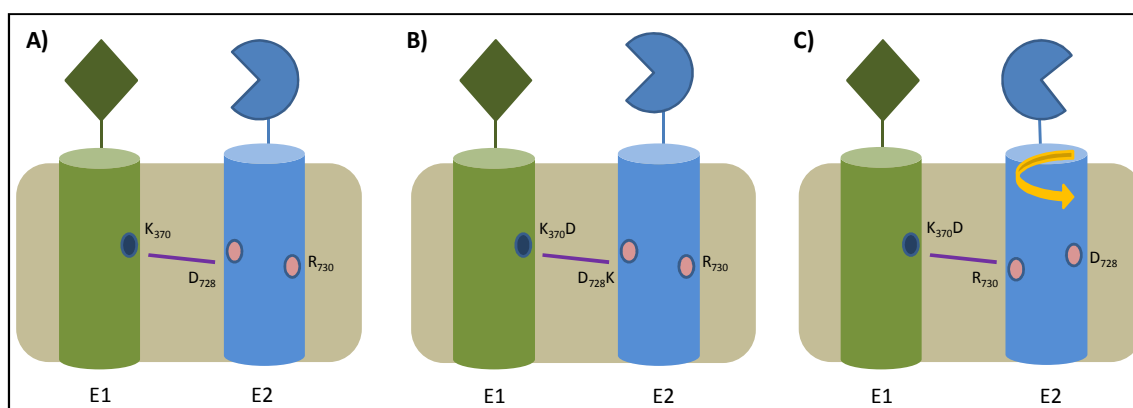


Figura 68. Representación esquemática de la hipótesis de giro del dominio transmembrana de E2. A) Disposición natural de las hélices transmembrana con la formación del puente salino. B) Recuperación ideal del puente salino al invertir las cargas entre ambos dominios. C) Hipótesis de posible formación de puente salino entre los residuos 370 y 730. La línea morada representa en todos los casos la formación del puente salino.

La formación de HCVpp con el triple mutante K370D-D728K-R730W supuso la recuperación del 30% de la capacidad de entrada de las pseudopartículas generadas, mientras que el mutante K370D-D728K-R730D no mejoró en nada dicha función. Esto supone una confirmación de que en el doble mutante K370D-D728K, el residuo de E1 interacciona inespecíficamente con R730, sin que se recupere la capacidad de entrada en las células. Sin embargo, cuando el residuo R730 se sustituye por W, impidiendo la formación del puente D370-R730, se recupera parte de la capacidad de entrada,

probablemente porque vuelve a formarse el puente salino nativo entre los residuos 370 de E1 y 728 de E2. Aunque la recuperación de la infectividad no llega al 100%, se puede considerar que es lo suficientemente significativa como para postular la importancia del puente salino en la correcta interacción de los dominios transmembrana de E1 y E2 para dar lugar a heterodímeros funcionales.

Residuo R730

Cuando en el doble mutante K370D-D728K se introduce una carga negativa en la posición 730 (triple mutante K370D-D728K-R730D) no se recupera la capacidad de entrada en las células diana. Estos resultados indican que el papel del residuo 730 de E2 no es mantener un balance de cargas cero. Cabe plantearse, por lo tanto, por qué existe este residuo cargado en el contexto hidrofóbico de una bicapa lipídica.

Por ello, también se ha estudiado la importancia de la presencia de una carga positiva en la secuencia del domino transmembrana de E2, próxima al descrito puente salino. Si partimos de la geometría de una hélice transmembrana, dos residuos separados dos posiciones quedarían casi en caras opuestas de la hélice. Si el residuo D728 de E2 está implicado en la formación de un puente salino con el residuo K370 de E1, y por lo tanto deben estar enfrentados, el residuo R730, situado a dos posiciones de D728, debería quedar expuesto hacia el entorno lipídico, originando una situación desfavorable. Los mutantes diseñados han consistido en la sustitución de R730 por un residuo de igual naturaleza pero menor tamaño (R730K), su intercambio por un residuo neutro, igualmente voluminoso (R730W) o de pequeño tamaño (R730A), y su reemplazo por un residuo de carga contraria (R730D).

Los mutantes de sustitución basados en la eliminación de la carga (R730A y R730W) son capaces de insertarse en la membrana según indica el método basado en la peptidasa Lep, comprobando que no se produce asociación a la membrana mediante el ensayo con proteinasa K. Sin embargo, tanto en el caso de disminución de tamaño manteniendo la carga (R730K) como en el intercambio de carga (R730D), la integración no es completa, produciéndose alrededor de un 15 y 28% de traslocación del péptido hidrofóbico, respectivamente. Los estudios de heterodimerización mediante el sistema BiFC, usando como pareja de asociación E1 sin modificar, revelaron una capacidad de heterodimerización entre el 75 y el 82% con respecto a E2 nativa, de modo que la interacción se produce, de nuevo, sin problemas aparentes y a pesar de las modificaciones. Tan sólo para el caso de R730D, se pierde un 70% la capacidad de interacción, pero hay que tener en cuenta que este mutante no se inserta correctamente. Sin embargo, también el sistema de pseudopartículas revela variaciones. Así, los mutantes R730K y R730W muestran una pérdida de capacidad de

entrada de un 25 y 18% respectivamente, mientras que la pérdida alcanza el 57% para R730A. En cualquier caso, estas mutaciones no anulan la capacidad de entrada.

Estos datos permiten concluir, en primer lugar, la importancia de la presencia de un residuo voluminoso en esa posición, tenga o no carga positiva, por lo que dicho residuo no debe estar implicado en ninguna interacción de tipo electrostático. La presencia de una carga negativa altera la capacidad de inserción en la bicapa y, por lo tanto, se ven afectados el resto de procesos. Por otro lado, se comprueba que la hélice de E2 es capaz de modificar su disposición en el interior de la bicapa lipídica para adaptarse a los residuos sustituidos y mantener la interacción con E1. Además, en este caso, esa modificación estructural a nivel transmembrana no parece alterar de manera importante la conformación de los ectodominios, que mantienen en cierto modo su capacidad de reconocimiento y entrada en las células diana.

No está claro, por tanto, cual es la razón por la que existe un residuo cargado en la posición 730; sin embargo, al contrario de lo que se podría suponer, éste no se ve afectado por encontrarse en un entorno hidrofóbico. Probablemente establezca interacciones con residuos próximos que eliminen la inestabilidad que supone una carga positiva en dicho entorno. De cualquier manera, cabe esperar que su presencia sea necesaria para alguna etapa del anclaje o del ciclo infectivo.

Determinación de los residuos iniciales de los dominios transmembrana y de la implicación del motivo GXXXG en heterodimerización

Con base en perfiles de hidropatía e hidrofobicidad, se han establecido las regiones transmembrana de E1 y E2 con una longitud de 31 y 29 residuos, respectivamente, comenzando en los residuos 353 (E1) y 718 (E2) y extendiéndose hasta el final de cada proteína.

Las bicapas lipídicas presentan, por norma general un espesor de 30 Å de núcleo hidrofóbico flanqueado por dos regiones de 15 Å. Siendo 1.5 Å el ascenso por residuo en una hélice α , son 20 aminoácidos los que tienen cabida en la región hidrofóbica de una membrana. Estudios estadísticos basados en proteínas cuya estructura tridimensional se conoce, establecen que la longitud media de una hélice transmembrana es de $24 \pm 5,6$ aminoácidos siendo mayoritarias las de 21. Las hélices menores de 17 y mayores de 38 aminoácidos son excluidas de las membranas [364]. Hasta el momento, la solución que se ha dado a la excesiva longitud de los dominios transmembrana de E1 y E2 es la aparición de una ruptura en las hélices, en las proximidades de los residuos cargados, que les permita acoplarse al espesor de la bicapa (figura 12, página 39) [171, 172].

Utilizando los ensayos de inserción de la proteína Lep modificada, que determinan la variación de la posición de una hélice en función de los residuos modificados [350], nuestro propósito ha sido determinar qué residuo ocupa la primera posición real de los segmentos transmembrana de E1 y E2. Un esquema explicativo de los cálculos llevados a cabo para obtener estos resultados se muestra en la figura 69. Nilsson y *col.* [351] demostraron que es 14 el número de residuos necesario, desde la membrana, para que la enzima OST (oligosacariltransferasa) pueda glicosilar un residuo de arginina en una secuencia N-X-S/T, siempre que X no sea prolina. Los resultados obtenidos indican que, considerando el residuo 14 aquel que presenta un 50% de mono y doble glicosilación, E1, al contrario de lo que estaba descrito hasta el momento, no comienza en torno al residuo 353, sino que el primer aminoácido en el interior de la bicapa se encuentra entre los residuos de isoleucina 359 y alanina en posición 360. El mismo estudio llevado a cabo para E2, no altera significativamente los datos publicados acerca del comienzo del dominio transmembrana de E2, que resulta ser la valina en posición 719, tan sólo un residuo posterior al fijado hasta el momento, la Tyr718.

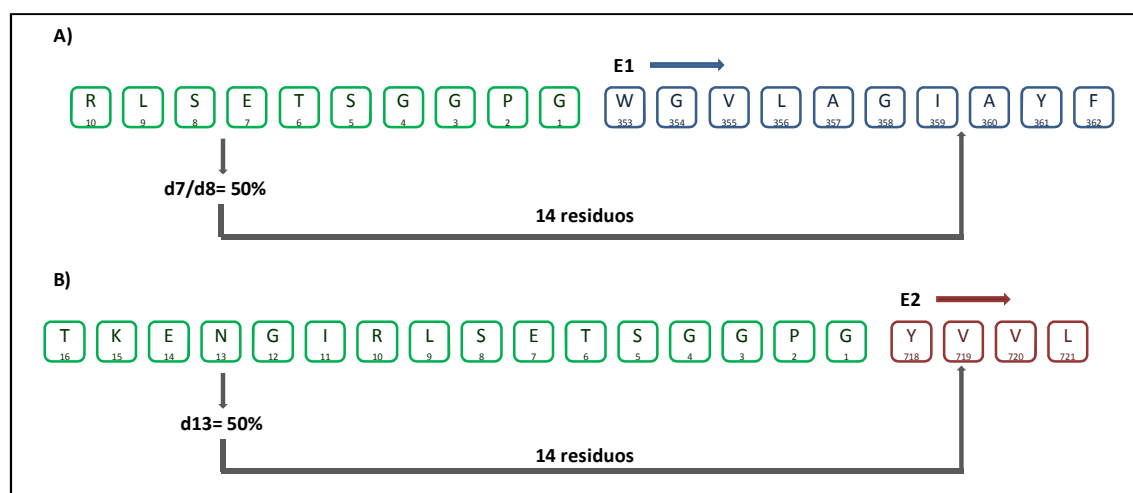


Figura 69. Esquema de la determinación del primer residuo transmembrana de las glicoproteínas E1 y E2. Los residuos remarcados en verde corresponden a la secuencia de Lep entre H2 y el inserto de interés. Los aminoácidos marcados en azul y rojo corresponden, respectivamente a las secuencias transmembrana de E1 (A) y E2 (B). Las líneas grises marcan la distancia de 14 residuos necesaria para que se produzca glicosilación.

El hecho de que E1 comience 6-7 aminoácidos por detrás de lo esperado, hace que el motivo GXXXG, comprendido entre las posiciones 354 y 358, descrito como un motivo de heterodimerización [165], quede fuera de la membrana, no pudiendo interactuar con E2 a nivel intramembranal. Este hecho ya había sido comentado en estudios de modelaje molecular, donde este motivo parecía quedar fuera de la región hidrofóbica de la hélice, no pudiendo, por tanto, interactuar con el dominio

transmembrana de E2 pero no descartando su importancia en heterodimerización [174].

Estudios de interacción (BiFC), llevados a cabo con la forma de E1 deletcionada comenzando en el residuo 359, revelaron que la disminución de la capacidad de interacción con la forma completa de E2 era de un 17%. Este hecho hace que el motivo GXXXG no pueda ser considerado un factor de heterodimerización por sí mismo. En cambio, según se había descrito previamente, es importante en homodimerización. Estudios llevados a cabo con el segmento transmembrana de la glicoforina A (GpA) habían definido la secuencia GXXXG como un claro motivo de homodimerización [365]. En el caso de E1, esta homodimerización se produce a niveles incluso mayores que la propia heterodimerización, disminuyendo un 50% su capacidad para interaccionar al eliminar el motivo GXXXG. De cualquier manera, este dato puede ser tratado como una mera anécdota ya que, debido al mecanismo descrito para la biogénesis de E1 y E2, E1 nunca tendrá la posibilidad de interaccionar consigo misma antes que con E2 (figura 70).

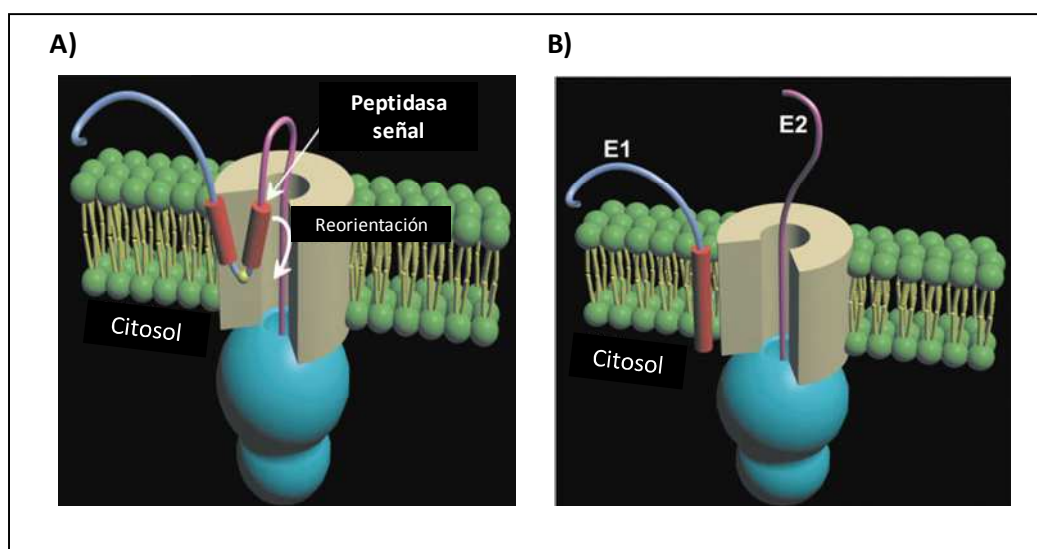


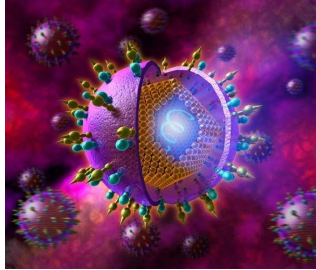
Figura 70. Mecanismo de biogénesis de E1 y E2. A) El dominio transmembrana de E1 se dobla en el interior del traslocón para dejar accesible la región de corte por la peptidasa señal. B) E1 sufre una reorientación y es liberada a la bicapa lipídica mientras se sintetiza E2, que seguirá el mismo proceso. Adaptada de [366].

Ante la posibilidad de que exista un doble mecanismo de heterodimerización capaz de asegurar la formación de heterodímeros que permitan la propagación del virus, se llevó a cabo el estudio de interacción del dominio acortado de E1 (E1₃₅₉) con el mutante del puente salino en E2 (D728A). Este experimento reveló que la pérdida de interacción es de un 12% sobre el 54% producido por el propio mutante quedando aún una interacción residual de en torno al 34%. Ésta será debida probablemente a

interacciones hidrofóbicas adicionales de naturaleza inespecífica que presentará E1 con E2, como las mostradas entre E1 y la hélice HI de Lep. El uso de R730A como control de sustitución por alanina también mostró una disminución de en torno al 12%, la misma que se había obtenido para E2 sin mutar. Esto indica, que el efecto de dicha región es independiente de la forma de E2 estudiada e insuficiente para ser considerado como un motivo alternativo de heterodimerización, teniendo que existir algún tipo de interacción hidrofóbica que refuerce los dos motivos de heterodimerización estudiados hasta ahora.

Tratando de desarrollar una hipótesis sobre las interacciones que determinan la formación del heterodímero E1-E2, se puede proponer que la presencia de un puente salino entre los dominios transmembrana es esencial para la obtención de heterodímeros funcionales pero no tanto para la simple interacción entre regiones transmembrana. Así, son sólo dos tipos de interacciones las que intervienen, de manera específica, en la formación de heterodímeros funcionales: la formación de un puente salino entre E1 y E2 y la presencia de un motivo GXXXG en E1. La capacidad de E1 para interaccionar de modo inespecífico con la hélice HI de Lep revela la presencia de un componente hidrofóbico, no descrito hasta el momento, como tercer motivo de interacción. Estos estudios ponen de manifiesto, por lo tanto, la diversidad de mecanismos que presentan los virus para mantener su propagación y la dificultad que supone el desarrollo de un método preventivo o curativo frente a ellos.

Además de la importancia que tienen estos estudios en el conocimiento de los mecanismos biológicos del HCV, la puesta a punto de estos ensayos, aplicados a los dominios transmembrana de E1 y E2, sirve como modelo para el estudio general de proteínas ancladas a membrana que tengan funcionalidad biológica, tanto como heterodímeros como en algunos casos como unidades homodiméricas, permitiendo así caracterizar residuos clave para mantener las interacciones en el seno de bicapas lipídicas así como la actividad biológica en sus formas nativas.



CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

Con el fin de determinar la importancia del péptido fusogénico de E1 en el contexto de la proteína quimérica E2E1 formada por los ectodominios aislados, así como, en el complejo E1-E2 formado por las glicoproteínas completas, se ha llevado a cabo la caracterización estructural, antigénica y funcional de la quimera E2E1 Δ 268-292 y el estudio de la formación y la capacidad de entrada de pseudopartículas infectivas HCVpp. Los resultados obtenidos permiten proponer las siguientes conclusiones:

1. Utilizando el sistema de expresión basado en *baculovirus*-células de insecto se ha podido aislar el mutante de delección E2E1 Δ 268-292. La caracterización estructural y antigénica revela que esta quimera presenta características de proteína plegada similares a las obtenidas para la quimera E2E1 con los ectodominios completos.
2. Los ensayos de interacción con liposomas permiten demostrar que la proteína E2E1 Δ 268-292 no altera las primeras etapas del proceso infectivo ya que no afecta ni a la agregación ni a la mezcla de lípidos, siendo ambos procesos favorecidos por un pH ácido.
3. En estudios de liberación de contenidos acuosos se pone de manifiesto que al eliminar la región fusogénica de E1 se requiere una concentración mayor de proteína para conseguir unos niveles de liberación similares a los que presenta la quimera con los ectodominios completos.
4. Los estudios llevados a cabo con las HCVpp en las que se elimina el péptido fusogénico () revelan que la proteína E1 delecionada se incorpora, junto con E2, adecuadamente a la superficie de las pseudopartículas.
5. Los ensayos de entrada de las pseudopartículas mutantes en las células diana Huh7 indican una pérdida prácticamente total de la capacidad de entrada del mutante C₁₃₂E1 Δ 268-292E2.
6. El conjunto de estos datos permite postular que el péptido fusogénico de E1 no interviene en las primeras etapas del proceso de fusión siendo crucial en etapas más avanzadas e impidiendo el acceso del virus a las células diana en su ausencia. Cabe pensar que su actuación se producirá por lo tanto de manera conjunta con los péptidos fusogénicos descritos para E2.

Con el fin de caracterizar las bases moleculares de la interacción entre los dominios transmembrana de E1 y E2 y con base en los estudios de integración llevados a cabo con la traducción-glicosilación *in vitro* de la *peptidasa señal* Lep modificada, los ensayos de heterodimerización por reconstitución de la proteína fluorescente Venus y los estudios de capacidad de entrada de pseudopartículas virales en células diana se puede concluir que:

7. Junto a los dominios transmembrana nativos de E1 y E2, todos los mutantes analizados conservan, en mayor o menor medida, la capacidad de integrarse en la membrana. Esto indica que no existe ningún residuo crítico para la inserción de E1 y E2 en la bicapa lipídica.

8. El principal motivo implicado en la correcta interacción entre los dominios transmembrana es el puente salino formado entre los residuos K370 y D728 de E1 y E2, respectivamente. La sustitución por alaninas no afecta igual a ambos residuos, permitiendo en el caso de K370A el mantenimiento de la heterodimerización, probablemente por la formación de un puente de hidrógeno entre los residuos R730 y N367. Sin embargo, esta interacción no da lugar a HCVpp funcionales.

9. El intercambio de las cargas entre ambos dominios transmembrana para generar el mutante K370D-D728K, sólo da lugar a pseudopartículas HCVpp funcionales cuando se bloquea la carga del residuo R730 para evitar la formación del puente salino no natural (D370-R730). Junto con los anteriores, estos resultados ponen de manifiesto la importancia de la presencia del puente salino entre los residuos K370 y D728 para que se produzca la correcta interacción entre los dominios transmembrana de E1 y E2 que dé lugar a heterodímeros funcionales.

10. El residuo R730 presente en E1 no contribuye a ningún tipo de interacción electrostática, siendo tan sólo necesaria la presencia de un residuo voluminoso en dicha posición para una correcta heterodimerización y entrada en las células diana.

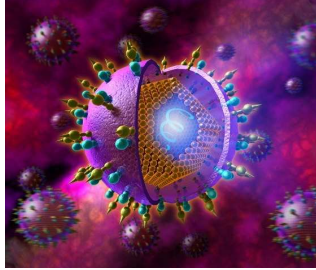
11. El primer residuo transmembrana de la glicoproteína E1 está situado en torno al aminoácido Ile359, 6 residuos por detrás del residuo W353 propuesto como el primero con base en los estudios de hidrofobicidad e hidropatía.

12. La nueva hélice transmembrana (I359-A383) deja el motivo GXXXG (residuos 354-358), descrito como un elemento de heterodimerización, en el exterior de la región de anclaje. Los ensayos de interacción llevados a cabo muestran que este motivo afecta tan sólo en torno a un 15% a dicha función. Por tanto, la región GXXXG

no puede ser considerada por sí misma como un mecanismo de salvaguarda para mantener la capacidad infectiva del virus aunque contribuya a ello.

13. Todos estos resultados ponen de manifiesto la existencia de dos tipos de interacciones específicas entre los dominios transmembrana de E1 y E2: la formación de un puente salino entre los residuos K370 y D728 y la presencia del motivo GXXXG en E1. Sin embargo, sigue existiendo un componente de interacción inespecífica, probablemente de carácter hidrofóbico.

La diversidad de los resultados obtenidos, pone de manifiesto la complejidad de los mecanismos de actuación de los virus. Sin embargo, es de esperar que los resultados que se presentan en este trabajo contribuyan al conocimiento de la biología molecular del HCV y al desarrollo de futuras vacunas contra la infección.



BIBLIOGRAFÍA

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Koutsoudakis, G., X. Forns, and S. Perez-del-Pulgar, *The molecular biology of hepatitis C virus*. Gastroenterologia Y Hepatologia, 2013. **36**(4): p. 280-293.
2. Choo, Q.L., G. Kuo, A.J. Weiner, L.R. Overby, D.W. Bradley, and M. Houghton, *Isolation of a Cdna Clone Derived from a Blood-Borne Non-a, Non-B Viral-Hepatitis Genome*. Science, 1989. **244**(4902): p. 359-362.
3. Cohen, J., *The scientific challenge of hepatitis C*. Science, 1999. **285**(5424): p. 26-30.
4. Kuiken C, S.P., *Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus*. Methods Mol Biol. , 2009. **510:33---53**.
5. Feld, J.J. and J.H. Hoofnagle, *Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C*. Nature, 2005. **436**(7053): p. 967-972.
6. Hajarizadeh, B., J. Grebely, and G.J. Dore, *Epidemiology and natural history of HCV infection*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2013. **10**(9): p. 553-62.
7. Bacon, B.R., S.C. Gordon, E. Lawitz, P. Marcellin, J.M. Vierling, S. Zeuzem, F. Poordad, Z.D. Goodman, H.L. Sings, F. Poordad, Z.D. Goodman, H.L. Sings, N. Boparai, M. Burroughs, C.A. Brass, J.K. Albrecht, R. Esteban, and H. Respond2-Investigators, *Boceprevir for Previously Treated Chronic HCV Genotype 1 Infection*. New England Journal of Medicine, 2011. **364**(13): p. 1207-1217.
8. Jacobson, I.M., J.G. McHutchison, G. Dusheiko, A.M. Di Bisceglie, K.R. Reddy, N.H. Bzowej, P. Marcellin, A.J. Muir, P. Ferenci, R. Flisiak, J. George, M. Rizzetto, D. Shouval, R. Sola, R.A. Terg, E.M. Yoshida, N. Adda, L. Bengtsson, A.J. Sankoh, T.L. Kieffer, S. George, R.S. Kauffman, S. Zeuzem, and A.S. Team, *Telaprevir for Previously Untreated Chronic Hepatitis C Virus Infection*. New England Journal of Medicine, 2011. **364**(25): p. 2405-2416.
9. Zeuzem, S., P. Andreone, S. Pol, E. Lawitz, M. Diago, S. Roberts, R. Focaccia, Z. Younossi, G.R. Foster, A. Horban, P. Ferenci, F. Nevens, B. Mullhaupt, P. Pockros, R. Terg, D. Shouval, B. van Hoek, O. Weiland, R. Van Heeswijk, S. De Meyer, D. Luo, G. Boogaerts, R. Polo, G. Picchio, M. Beumont, and R.S. Team, *Telaprevir for Retreatment of HCV Infection*. New England Journal of Medicine, 2011. **364**(25): p. 2417-2428.
10. Kohli, A., A. Shaffer, A. Sherman, and S. Kottlil, *Treatment of hepatitis C: a systematic review*. JAMA, 2014. **312**(6): p. 631-40.
11. Lindenbach, B.D., M.J. Evans, A.J. Syder, B. Wolk, T.L. Tellinghuisen, C.C. Liu, T. Maruyama, R.O. Hynes, D.R. Burton, J.A. McKeating, and C.M. Rice, *Complete replication of hepatitis C virus in cell culture*. Science, 2005. **309**(5734): p. 623-626.
12. Wakita, T., T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, Z.J. Zhao, K. Murthy, A. Habermann, H.G. Krasslich, M. Mizokami, R. Bartenschlager, and T.J. Liang, *Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome (vol 11, pg 791, 2005)*. Nature Medicine, 2005. **11**(8): p. 905-905.
13. Zhong, J., P. Gastaminza, G.F. Cheng, S. Kapadia, T. Kato, D.R. Burton, S.F. Wieland, S.L. Uprichard, T. Wakita, and F.V. Chisari, *Robust hepatitis C virus infection in vitro*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(26): p. 9294-9299.
14. Lindenbach, B.D.R., C. M, *Flaviridae: The Viruses and Their Replication*. Fields Virol. Knipe, D. y Howley, P. M., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.: 41, 2001.
15. Simons, J.N., T.P. Leary, G.J. Dawson, T.J. Pilotmatias, A.S. Muerhoff, G.G. Schlauder, S.M. Desai, and I.K. Mushahwar, *Isolation of Novel Virus-Like Sequences Associated with Human Hepatitis*. Nature Medicine, 1995. **1**(6): p. 564-569.

16. Simons, J.N., T.J. Pilotmatias, T.P. Leary, G.J. Dawson, S.M. Desai, G.G. Schlauder, A.S. Muerhoff, J.C. Erker, S.L. Buijk, M.L. Chalmers, C.L. Vansant, and I.K. Mushahwar, *Identification of 2 Flavivirus-Like Genomes in the Gb Hepatitis Agent*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995. **92**(8): p. 3401-3405.
17. Thiel HJ, C.M., Gould EA, , *Family Flaviviridae*. Virus Taxonomy. VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press, 2005: p. p.979-96.
18. Kapoor, A., P. Simmonds, E.J. Dubovi, N. Qaisar, J.A. Henriquez, J. Medina, S. Shields, and W.I. Lipkin, *Characterization of a Canine Homolog of Human Aichivirus*. Journal of Virology, 2011. **85**(21): p. 11520-11525.
19. Yu, X.K., M. Qiao, I. Atanasov, Z.Y. Hu, T. Kato, T.J. Liang, and Z.H. Zhou, *Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstructions of hepatitis C virus particles*. Virology, 2007. **367**(1): p. 126-134.
20. Li, X., L.J. Jeffers, L. Shao, K.R. Reddy, M. deMedina, J. Scheffel, B. Moore, and E.R. Schiff, *Identification of hepatitis C virus by immunoelectron microscopy*. Journal of Viral Hepatitis, 1995. **2**(5): p. 227-234.
21. Prince, A.M., T. HuimaByron, T.S. Parker, and D.M. Levine, *Visualization of hepatitis C virions and putative defective interfering particles isolated from low-density lipoproteins*. Journal of Viral Hepatitis, 1996. **3**(1): p. 11-17.
22. Kaito, M., S. Watanabe, K. Tsukiyamakohara, K. Yamaguchi, Y. Kobayashi, M. Konishi, M. Yokoi, S. Ishida, S. Suzuki, and M. Kohara, *Hepatitis-C Virus Particle Detected by Immunoelectron Microscopic Study*. Journal of General Virology, 1994. **75**: p. 1755-1760.
23. Gastaminza, P., K.A. Dryden, B. Boyd, M.R. Wood, M. Law, M. Yeager, and F.V. Chisari, *Ultrastructural and Biophysical Characterization of Hepatitis C Virus Particles Produced in Cell Culture*. Journal of Virology, 2010. **84**(21): p. 10999-11009.
24. Merz, A., G. Long, M.S. Hiet, B. Brugger, P. Chlanda, P. Andre, F. Wieland, J. Krijnse-Locker, and R. Bartenschlager, *Biochemical and Morphological Properties of Hepatitis C Virus Particles and Determination of Their Lipidome*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(4): p. 3018-3032.
25. Agnello, V., G. Abel, M. Elfahal, G.B. Knight, and Q.X. Zhang, *Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(22): p. 12766-12771.
26. Hijikata, M., Y.K. Shimizu, H. Kato, A. Iwamoto, J.W. Shih, H.J. Alter, R.H. Purcell, and H. Yoshikura, *Equilibrium Centrifugation Studies of Hepatitis-C Virus - Evidence for Circulating Immune-Complexes*. Journal of Virology, 1993. **67**(4): p. 1953-1958.
27. Kanto, T., N. Hayashi, T. Takehara, H. Hagiwara, E. Mita, M. Naito, A. Kasahara, H. Fusamoto, and T. Kamada, *Buoyant Density of Hepatitis-C Virus Recovered from Infected Hosts - 2 Different Features in Sucrose Equilibrium Density-Gradient Centrifugation Related to Degree of Liver Inflammation*. Hepatology, 1994. **19**(2): p. 296-302.
28. Manzin, A., L. Solforosi, E. Petrelli, G. Macarri, G. Tosone, M. Piazza, and M. Clementi, *Evolution of hypervariable region 1 of hepatitis C virus in primary infection*. Journal of Virology, 1998. **72**(7): p. 6271-6276.
29. Monazahian, M., I. Bohme, S. Bonk, A. Koch, C. Scholz, S. Grethe, and R. Thomssen, *Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus*. Journal of Medical Virology, 1999. **57**(3): p. 223-229.
30. Pumeechockchai, W., D. Bevitt, K. Agarwal, T. Petropoulou, B.C.A. Langer, B. Belohradsky, M.F. Bassendine, and G.L. Toms, *Hepatitis C virus particles of different*

- density in the blood of chronically infected immunocompetent and immunodeficient patients: Implications for virus clearance by antibody. *Journal of Medical Virology*, 2002. **68**(3): p. 335-342.
31. Bradley, D., K. Mccaustland, K. Krawczynski, J. Spelbring, C. Humphrey, and E.H. Cook, *Hepatitis-C Virus - Buoyant Density of the Factor-Viii-Derived Isolate in Sucrose*. *Journal of Medical Virology*, 1991. **34**(3): p. 206-208.
 32. Friebe, P. and R. Bartenschlager, *Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication*. *Journal of Virology*, 2002. **76**(11): p. 5326-5338.
 33. Friebe, P., V. Lohmann, N. Krieger, and R. Bartenschlager, *Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication*. *Journal of Virology*, 2001. **75**(24): p. 12047-12057.
 34. Kim, Y.K., C.S. Kim, S.H. Lee, and S.K. Jang, *Domains I and II in the 5' nontranslated region of the HCV genome are required for RNA replication*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002. **290**(1): p. 105-112.
 35. Murayama, A., T. Date, K. Morikawa, D. Akazawa, M. Miyamoto, M. Kaga, K. Ishii, T. Suzuki, T. Kato, M. Mizokami, and T. Wakita, *The NS3 helicase and NS5B-to-3' X regions are important for efficient hepatitis C virus strain JFH-1 replication in Huh7 cells*. *Journal of Virology*, 2007. **81**(15): p. 8030-8040.
 36. Niepmann, M., *Hepatitis C Virus RNA Translation*. *Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy*, 2013. **369**: p. 143-166.
 37. Choo, Q.L., K.H. Richman, J.H. Han, K. Berger, C. Lee, C. Dong, C. Gallegos, D. Coit, A. Medinaselby, P.J. Barr, A.J. Weiner, D.W. Bradley, G. Kuo, and M. Houghton, *Genetic Organization and Diversity of the Hepatitis-C Virus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991. **88**(6): p. 2451-2455.
 38. Kato, N., M. Hijikata, Y. Ootsuyama, M. Nakagawa, S. Ohkoshi, T. Sugimura, and K. Shimotohno, *Molecular-Cloning of the Human Hepatitis-C Virus Genome from Japanese Patients with Non-a, Non-B Hepatitis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990. **87**(24): p. 9524-9528.
 39. Honda, M., E.A. Brown, and S.M. Lemon, *Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA*. *Rna-a Publication of the Rna Society*, 1996. **2**(10): p. 955-968.
 40. Honda, M., L.H. Ping, R.C.A. Rijnbrand, E. Amphlett, B. Clarke, D. Rowlands, and S.M. Lemon, *Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA*. *Virology*, 1996. **222**(1): p. 31-42.
 41. Hellen, C.U.T. and P. Sarnow, *Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules*. *Genes & Development*, 2001. **15**(13): p. 1593-1612.
 42. Rijnbrand, R., P. Bredenbeek, T. Vanderstraaten, L. Whetter, G. Inchauspe, S. Lemon, and W. Spaan, *Almost the Entire 5' Non-Translated Region of Hepatitis-C Virus Is Required for Cap-Independent Translation*. *Febs Letters*, 1995. **365**(2-3): p. 115-119.
 43. Wang, C.Y., S.Y. Le, N. Ali, and A. Siddiqui, *An Rna Pseudoknot Is an Essential Structural Element of the Internal Ribosome Entry Site Located within the Hepatitis-C Virus 5'-Noncoding Region*. *Rna-a Publication of the Rna Society*, 1995. **1**(5): p. 526-537.
 44. Popescu, C.I., L. Riva, O. Vlaicu, R. Farhat, Y. Rouille, and J. Dubuisson, *Hepatitis C virus life cycle and lipid metabolism*. *Biology (Basel)*, 2014. **3**(4): p. 892-921.
 45. Jangra, R.K., M. Yi, and S.M. Lemon, *Regulation of Hepatitis C Virus Translation and Infectious Virus Production by the MicroRNA miR-122*. *Journal of Virology*, 2010. **84**(13): p. 6615-6625.
 46. Li, Y.P., J.M. Gottwein, T.K. Scheel, T.B. Jensen, and J. Bukh, *MicroRNA-122 antagonism against hepatitis C virus genotypes 1-6 and reduced efficacy by host RNA insertion or*

- mutations in the HCV 5' UTR*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011. **108**(12): p. 4991-4996.
47. Lanford, R.E., E.S. Hildebrandt-Eriksen, A. Petri, R. Persson, M. Lindow, M.E. Munk, S. Kauppinen, and H. Orum, *Therapeutic Silencing of MicroRNA-122 in Primates with Chronic Hepatitis C Virus Infection*. Science, 2010. **327**(5962): p. 198-201.
48. Blight, K.J. and C.M. Rice, *Secondary structure determination of the conserved 98-base sequence at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA*. Journal of Virology, 1997. **71**(10): p. 7345-7352.
49. Tanaka, T., N. Kato, M.J. Cho, and K. Shimotohno, *A Novel Sequence Found at the 3'-Terminus of Hepatitis-C Virus Genome*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1995. **215**(2): p. 744-749.
50. Tanaka, T., N. Kato, M.J. Cho, K. Sugiyama, and K. Shimotohno, *Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome*. Journal of Virology, 1996. **70**(5): p. 3307-3312.
51. Spangberg, K., L. Wiklund, and S. Schwartz, *Binding of the La autoantigen to the hepatitis C virus 3' untranslated region protects the RNA from rapid degradation in vitro*. Journal of General Virology, 2001. **82**: p. 113-120.
52. Ito, T., S.M. Tahara, and M.M.C. Lai, *The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site*. Journal of Virology, 1998. **72**(11): p. 8789-8796.
53. Kolykhalov, A.A., K. Mihalik, S.M. Feinstone, and C.M. Rice, *Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo*. Journal of Virology, 2000. **74**(4): p. 2046-2051.
54. Yanagi, M., M. St Claire, S.U. Emerson, R.H. Purcell, and J. Bukh, *In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(5): p. 2291-2295.
55. Moradpour, D. and F. Penin, *Hepatitis C Virus Proteins: From Structure to Function*. Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy, 2013. **369**: p. 113-142.
56. Boulant, S., C. Vanbelle, C. Ebel, F. Penin, and J.P. Lavergne, *Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features*. Journal of Virology, 2005. **79**(17): p. 11353-11365.
57. Santolini, E., G. Migliaccio, and N. Lamonica, *Biosynthesis and Biochemical-Properties of the Hepatitis-C Virus Core Protein*. Journal of Virology, 1994. **68**(6): p. 3631-3641.
58. Walter, P. and A.E. Johnson, *Signal Sequence Recognition and Protein Targeting to the Endoplasmic-Reticulum Membrane*. Annual Review of Cell Biology, 1994. **10**: p. 87-119.
59. McLauchlan, J., M.K. Lemberg, G. Hope, and B. Martoglio, *Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets*. Embo Journal, 2002. **21**(15): p. 3980-3988.
60. Miyanari, Y., K. Atsuzawa, N. Usuda, K. Watashi, T. Hishiki, M. Zayas, R. Bartenschlager, T. Wakita, M. Hijikata, and K. Shimotohno, *The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production*. Nature Cell Biology, 2007. **9**(9): p. 1089-U74.
61. Strosberg, A.D., S. Kota, V. Takahashi, J.K. Snyder, and G. Mousseau, *Core as a novel viral target for hepatitis C drugs*. Viruses, 2010. **2**(8): p. 1734-51.
62. Barba, G., F. Harper, T. Harada, M. Kohara, S. Goulinet, Y. Matsuura, G. Eder, Z. Schaff, M.J. Chapman, T. Miyamura, and C. Brechot, *Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. **94**(4): p. 1200-1205.

63. Moriya, K., H. Yotsuyanagi, Y. Shintani, H. Fujie, K. Ishibashi, Y. Matsuura, T. Miyamura, and K. Koike, *Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice*. Journal of General Virology, 1997. **78**: p. 1527-1531.
64. McLauchlan, J., *Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes*. Journal of Viral Hepatitis, 2000. **7**(1): p. 2-14.
65. Branch, A.D., D.D. Stump, J.A. Gutierrez, F. Eng, and J.L. Walewski, *The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: The alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others*. Seminars in Liver Disease, 2005. **25**(1): p. 105-117.
66. Moradpour, D., F. Penin, and C.M. Rice, *Replication of hepatitis C virus*. Nature Reviews Microbiology, 2007. **5**(6): p. 453-463.
67. Bain, C., P. Parroche, J.P. Lavergne, B. Duverger, C. Vieux, V. Dubois, F. Komurian-Pradel, C. Trepo, L. Gebuhrer, G. Paranhos-Baccala, F. Penin, and G. Inchauspe, *Memory T-cell-mediated immune responses specific to an alternative core protein in hepatitis C virus infection*. Journal of Virology, 2004. **78**(19): p. 10460-10469.
68. Walewski, J.L., T.R. Keller, D.D. Stump, and A.D. Branch, *Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame*. Rna-a Publication of the Rna Society, 2001. **7**(5): p. 710-721.
69. Bartosch, B., J. Dubuisson, and F.L. Cosset, *Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes*. J Exp Med, 2003. **197**(5): p. 633-42.
70. Nielsen, S.U., M.F. Bassendine, A.D. Burt, D.J. Bevitt, and G.L. Toms, *Characterization of the genome and structural proteins of hepatitis C virus resolved from infected human liver*. Journal of General Virology, 2004. **85**: p. 1497-1507.
71. Deleersnyder, V., A. Pillez, C. Wychowski, K. Blight, J. Xu, Y.S. Hahn, C.M. Rice, and J. Dubuisson, *Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes*. J Virol, 1997. **71**(1): p. 697-704.
72. Carrere-Kremer, S., C. Montpellier-Pala, L. Cocquerel, C. Wychowski, F. Penin, and J. Dubuisson, *Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus*. Journal of Virology, 2002. **76**(8): p. 3720-3730.
73. Lin, C., B.D. Lindenbach, B.M. Pragai, D.W. Mccourt, and C.M. Rice, *Processing in the Hepatitis-C Virus E2-Ns2 Region - Identification of P7 and 2 Distinct E2-Specific Products with Different C-Termini*. Journal of Virology, 1994. **68**(8): p. 5063-5073.
74. Harada, M., Y. Fujisawa, S. Sakisaka, T. Kawaguchi, E. Taniguchi, M. Sakamoto, S. Sumie, K. Sasatomi, H. Koga, T. Torimura, T. Ueno, K. Gondo, H. Yoshida, K. Tanikawa, and M. Sata, *High prevalence of anticardiolipin antibodies in hepatitis C virus infection: lack of effects on thrombocytopenia and thrombotic complications*. Journal of Gastroenterology, 2000. **35**(4): p. 272-277.
75. Griffin, S.D.C., L.P. Beales, D.S. Clarke, O. Worsfold, S.D. Evans, J. Jaeger, M.P.G. Harris, and D.J. Rowlands, *The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine*. Febs Letters, 2003. **535**(1-3): p. 34-38.
76. Atoom, A.M., N.G.A. Taylor, and R.S. Russell, *The elusive function of the hepatitis C virus p7 protein*. Virology, 2014. **462**: p. 377-387.
77. Atoom, A.M., D.M. Jones, and R.S. Russell, *Evidence suggesting that HCV p7 protects E2 glycoprotein from premature degradation during virus production*. Virus Res, 2013. **176**(1-2): p. 199-210.
78. Luik, P., C. Chew, J. Aittoniemi, J. Chang, P. Wentworth, R.A. Dwek, P.C. Biggin, C. Venien-Bryan, and N. Zitzmann, *The 3-dimensional structure of a hepatitis C virus p7 ion channel by electron microscopy*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009. **106**(31): p. 12712-12716.

79. Pavlovic, D., D.C.A. Neville, O. Argaud, B. Blumberg, R.A. Dwek, W.B. Fischer, and N. Zitzmann, *The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(10): p. 6104-6108.
80. Jones, C.T., C.L. Murray, D.K. Eastman, J. Tassello, and C.M. Rice, *Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus*. Journal of Virology, 2007. **81**(16): p. 8374-8383.
81. Gentzsch, J., C. Brohm, E. Steinmann, M. Friesland, N. Menzel, G. Vieyres, P.M. Perin, A. Frentzen, L. Kaderali, and T. Pietschmann, *hepatitis c Virus p7 is critical for capsid assembly and envelopment*. PLoS Pathog, 2013. **9**(5): p. e1003355.
82. Harada, T., N. Tautz, and H.J. Thiel, *E2-p7 region of the bovine viral diarrhea virus polyprotein: Processing and functional studies*. Journal of Virology, 2000. **74**(20): p. 9498-9506.
83. Shanmugam, S. and M.Y. Yi, *Efficiency of E2-p7 Processing Modulates Production of Infectious Hepatitis C Virus*. Journal of Virology, 2013. **87**(20): p. 11255-11266.
84. Carrere-Kremer, S., C. Montpellier, L. Lorenzo, B. Brulin, L. Cocquerel, S. Belouzard, F. Penin, and J. Dubuisson, *Regulation of hepatitis C virus polyprotein processing by signal peptidase involves structural determinants at the p7 sequence junctions*. J Biol Chem, 2004. **279**(40): p. 41384-92.
85. Steinmann, E., F. Penin, S. Kallis, A.H. Patel, R. Bartenschlager, and T. Pietschmann, *Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions*. Plos Pathogens, 2007. **3**(7): p. 962-971.
86. Lorenz, I.C., J. Marcotrigiano, T.G. Dentzer, and C.M. Rice, *Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease*. Nature, 2006. **442**(7104): p. 831-835.
87. Lohmann, V., F. Korner, J.O. Koch, U. Herian, L. Theilmann, and R. Bartenschlager, *Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line*. Science, 1999. **285**(5424): p. 110-113.
88. Jirasko, V., R. Montserret, J.Y. Lee, J. Gouttenoire, D. Moradpour, F. Penin, and R. Bartenschlager, *Structural and Functional Studies of Nonstructural Protein 2 of the Hepatitis C Virus Reveal Its Key Role as Organizer of Virion Assembly*. Plos Pathogens, 2010. **6**(12).
89. Ma, Y.H., M. Anantpadma, J.M. Timpe, S. Shanmugam, S.M. Singh, S.M. Lemon, and M.K. Yi, *Hepatitis C Virus NS2 Protein Serves as a Scaffold for Virus Assembly by Interacting with both Structural and Nonstructural Proteins*. Journal of Virology, 2011. **85**(1): p. 86-97.
90. Popescu, C.I., N. Callens, D. Trinel, P. Roingeard, D. Moradpour, V. Descamps, G. Duverlie, F. Penin, L. Heliot, Y. Rouille, and J. Dubuisson, *NS2 Protein of Hepatitis C Virus Interacts with Structural and Non-Structural Proteins towards Virus Assembly*. Plos Pathogens, 2011. **7**(2).
91. Foy, E., K. Li, C.F. Wang, R. Sumpter, M. Ikeda, S.M. Lemon, and M. Gale, *Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease*. Science, 2003. **300**(5622): p. 1145-1148.
92. Ma, Y.H., J. Yates, Y.Q. Liang, S.M. Lemon, and M.K. Yi, *NS3 helicase domains involved in infectious intracellular hepatitis C virus particle assembly*. Journal of Virology, 2008. **82**(15): p. 7624-7639.
93. Kim, J.L., K.A. Morgenstern, C. Lin, T. Fox, M.D. Dwyer, J.A. Landro, S.P. Chambers, W. Markland, C.A. Lepre, E.T. OMalley, S.L. Harbeson, C.M. Rice, M.A. Murcko, P.R. Caron, and J.A. Thomson, *Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide*. Cell, 1996. **87**(2): p. 343-355.
94. Love, R.A., H.E. Parge, J.A. Wickersham, Z. Hostomsky, N. Habuka, E.W. Moomaw, T. Adachi, and Z. Hostomska, *The crystal structure of hepatitis C virus NS3 proteinase*

- reveals a trypsin-like fold and a structural zinc binding site. *Cell*, 1996. **87**(2): p. 331-342.
95. Yao, N.H., P. Reichert, S.S. Taremi, W.W. Prosser, and P.C. Weber, *Molecular views of viral polyprotein processing revealed by the crystal structure of the hepatitis C virus bifunctional protease-helicase*. *Structure with Folding & Design*, 1999. **7**(11): p. 1353-1363.
 96. Lundin, M., M. Monne, A. Widell, G. von Heijne, and M.A.A. Persson, *Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B*. *Journal of Virology*, 2003. **77**(9): p. 5428-5438.
 97. Egger, D., B. Wolk, R. Gosert, L. Bianchi, H.E. Blum, D. Moradpour, and K. Bienz, *Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex*. *Journal of Virology*, 2002. **76**(12): p. 5974-5984.
 98. Gosert, R., D. Egger, V. Lohmann, R. Bartenschlager, H.E. Blum, K. Bienz, and D. Moradpour, *Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons*. *Journal of Virology*, 2003. **77**(9): p. 5487-5492.
 99. Elazar, M., P. Liu, C.M. Rice, and J.S. Glenn, *An n-terminal amphipathic helix in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates membrane association, correct localization of replication complex proteins, and HCV RNA replication*. *Journal of Virology*, 2004. **78**(20): p. 11393-11400.
 100. Einav, S., E.H. Sklan, H.M. Moon, E. Gehrig, P. Liu, Y. Hao, A.W. Lowe, and J.S. Glenn, *The nucleotide binding motif of hepatitis C virus NS4B can mediate cellular transformation and tumor formation without ha-ras co-transfection*. *Hepatology*, 2008. **47**(3): p. 827-835.
 101. Einav, S., M. Elazar, T. Danieli, and J.S. Glenn, *A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication*. *Journal of Virology*, 2004. **78**(20): p. 11288-11295.
 102. Tellinghuisen, T.L., J. Marcotrigiano, and C.M. Rice, *Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase*. *Nature*, 2005. **435**(7040): p. 374-379.
 103. Tellinghuisen, T.L., J. Marcotrigiano, A.E. Gorbalenya, and C.M. Rice, *The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein*. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. **279**(47): p. 48576-48587.
 104. Brass, V., E. Bieck, R. Montserret, B. Wolk, J.A. Hellings, H.E. Blum, F. Penin, and D. Moradpour, *An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(10): p. 8130-8139.
 105. Hinson, E.R. and P. Cresswell, *The antiviral protein, viperin, localizes to lipid droplets via its N-terminal amphipathic alpha-helix*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009. **106**(48): p. 20452-20457.
 106. Tellinghuisen, T.L., K.L. Foss, J.C. Treadaway, and C.M. Rice, *Identification of residues required for RNA replication in domains II and III of the hepatitis C virus NS5A protein*. *Journal of Virology*, 2008. **82**(3): p. 1073-1083.
 107. Tellinghuisen, T.L. and K.L. Foss, *Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein*. *Plos Pathogens*, 2008. **4**(3).
 108. Appel, N., M. Zayas, S. Miller, J. Krijnse-Locker, T. Schaller, P. Friebe, S. Kallis, U. Engel, and R. Bartenschlager, *Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly*. *Plos Pathogens*, 2008. **4**(3).
 109. Masaki, T., R. Suzuki, K. Murakami, H. Aizaki, K. Ishii, A. Murayama, T. Date, Y. Matsuura, T. Miyamura, T. Wakita, and T. Suzuki, *Interaction of hepatitis c virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles*. *Journal of Virology*, 2008. **82**(16): p. 7964-7976.

110. Hughes, M., S. Griffin, and M. Harris, *Domain III of NS5A contributes to both RNA replication and assembly of hepatitis C virus particles*. Journal of General Virology, 2009. **90**: p. 1329-1334.
111. Kaneko, T., Y. Tanji, S. Satoh, M. Hijikata, S. Asabe, K. Kimura, and K. Shimotohno, *Production of 2 Phosphoproteins from the Ns5a Region of the Hepatitis-C Viral Genome*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1994. **205**(1): p. 320-326.
112. Evans, M.J., C.M. Rice, and S.P. Goff, *Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(35): p. 13038-13043.
113. Ivanov, A.V., V.L. Tunitskaya, O.N. Ivanova, V.A. Mitkevich, V.S. Prassolov, A.A. Makarov, M.K. Kukhanova, and S.N. Kochetkov, *Hepatitis C virus NS5A protein modulates template selection by the RNA polymerase in in vitro system*. Febs Letters, 2009. **583**(2): p. 277-280.
114. Neddermann, P., M. Quintavalle, C. Di Pietro, A. Clementi, M. Cerretani, S. Altamura, L. Bartholomew, and R. De Francesco, *Reduction of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by selective inhibition of cellular kinases activates viral RNA replication in cell culture*. Journal of Virology, 2004. **78**(23): p. 13306-13314.
115. Lee, H., H. Shin, E. Wimmer, and A.V. Paul, *cis-Acting RNA signals in the NS5B c-terminal coding sequence of the hepatitis C virus genome*. Journal of Virology, 2004. **78**(20): p. 10865-10877.
116. Schmidt-Mende, J., E. Bieck, T. Hugle, F. Penin, C.M. Rice, H.E. Blum, and D. Moradpour, *Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(47): p. 44052-44063.
117. Lesburg, C.A., M.B. Cable, E. Ferrari, Z. Hong, A.F. Mannarino, and P.C. Weber, *Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site*. Nature Structural Biology, 1999. **6**(10): p. 937-943.
118. Lohmann, V., A. Roos, F. Korner, J.O. Koch, and R. Bartenschlager, *Biochemical and structural analysis of the NS5B RNA-dependent RNA polymerase of the hepatitis C virus*. Journal of Viral Hepatitis, 2000. **7**(3): p. 167-174.
119. Bressanelli, S., L. Tomei, A. Roussel, I. Incitti, R.L. Vitale, M. Mathieu, R. De Francesco, and F.A. Rey, *Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(23): p. 13034-13039.
120. Appleby, T.C., J.K. Perry, E. Murakami, O. Barauskas, J. Feng, A. Cho, D. Fox, 3rd, D.R. Wetmore, M.E. McGrath, A.S. Ray, M.J. Sofia, S. Swaminathan, and T.E. Edwards, *Viral replication. Structural basis for RNA replication by the hepatitis C virus polymerase*. Science, 2015. **347**(6223): p. 771-5.
121. Cocquerel, L., A. Op de Beeck, M. Lambot, J. Roussel, D. Delgrange, A. Pillez, C. Wychowski, F. Penin, and J. Dubuisson, *Topological changes in the transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins*. EMBO J, 2002. **21**(12): p. 2893-902.
122. von Heijne, G., *Membrane-protein topology*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(12): p. 909-18.
123. Dubuisson, J., H.H. Hsu, R.C. Cheung, H.B. Greenberg, D.G. Russell, and C.M. Rice, *Formation and Intracellular-Localization of Hepatitis-C Virus Envelope Glycoprotein Complexes Expressed by Recombinant Vaccinia and Sindbis Viruses*. Journal of Virology, 1994. **68**(10): p. 6147-6160.

124. Patel, J., A.H. Patel, and J. McLauchlan, *The transmembrane domain of the hepatitis C virus E2 glycoprotein is required for correct folding of the E1 glycoprotein and native complex formation*. *Virology*, 2001. **279**(1): p. 58-68.
125. Michalak, J.P., C. Wychowski, A. Choukhi, J.C. Meunier, S. Ung, C.M. Rice, and J. Dubuisson, *Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins*. *Journal of General Virology*, 1997. **78**: p. 2299-2306.
126. Cocquerel, L., E.R. Quinn, M. Flint, K.G. Hadlock, S.K.H. Fong, and S. Levy, *Recognition of native hepatitis C virus E1E2 heterodimers by a human monoclonal antibody*. *Journal of Virology*, 2003. **77**(2): p. 1604-1609.
127. Brazzoli, M., A. Helenius, S.K.H. Fong, M. Houghton, S. Abrignani, and M. Merola, *Folding and dimerization of hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins in stably transfected CHO cells*. *Virology*, 2005. **332**(1): p. 438-453.
128. Rodriguez-Rodriguez, M., D. Tello, B. Yelamos, J. Gomez-Gutierrez, B. Pacheco, S. Ortega, A.G. Serrano, D.L. Peterson, and F. Gavilanes, *Structural properties of the ectodomain of hepatitis C virus E2 envelope protein*. *Virus Res*, 2009. **139**(1): p. 91-9.
129. Whidby, J., G. Mateu, H. Scarborough, B. Demeler, A. Grakoui, and J. Marcotrigiano, *Blocking Hepatitis C Virus Infection with Recombinant Form of Envelope Protein 2 Ectodomain*. *Journal of Virology*, 2009. **83**(21): p. 11078-11089.
130. Ortega-Atienza, S., L. Lombana, J. Gomez-Gutierrez, B. Yelamos, D.L. Peterson, and F. Gavilanes, *Production and characterization of the ectodomain of E2 envelope glycoprotein of hepatitis C virus folded in the presence of full-length E1 glycoprotein*. *Protein Expr Purif*, 2014. **104C**: p. 20-25.
131. Merola, M., M. Brazzoli, F. Cocchiarella, J.M. Heile, A. Helenius, A.J. Weiner, M. Houghton, and S. Abrignani, *Folding of hepatitis C virus E1 glycoprotein in a cell-free system*. *J Virol*, 2001. **75**(22): p. 11205-17.
132. Dubuisson, J. and C.M. Rice, *Hepatitis C virus glycoprotein folding: Disulfide bond formation and association with calnexin*. *Journal of Virology*, 1996. **70**(2): p. 778-786.
133. Choukhi, A., S. Ung, C. Wychowski, and J. Dubuisson, *Involvement of endoplasmic reticulum chaperones in the folding of hepatitis C virus glycoproteins*. *Journal of Virology*, 1998. **72**(5): p. 3851-3858.
134. Deleersnyder, V., A. Piliez, C. Wychowski, K. Blight, J. Xu, Y.S. Hahn, C.M. Rice, and J. Dubuisson, *Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes*. *Journal of Virology*, 1997. **71**(1): p. 697-704.
135. Op De Beeck, A., C. Voisset, B. Bartosch, Y. Ciczora, L. Cocquerel, Z. Keck, S. Fong, F.L. Cosset, and J. Dubuisson, *Characterization of functional hepatitis C virus envelope glycoproteins*. *J Virol*, 2004. **78**(6): p. 2994-3002.
136. Flint, M., C. Logvinoff, C.M. Rice, and J.A. McKeating, *Characterization of infectious retroviral pseudotype particles bearing hepatitis C virus glycoproteins*. *Journal of Virology*, 2004. **78**(13): p. 6875-6882.
137. Vieyres, G., X. Thomas, V. Descamps, G. Duverlie, A.H. Patel, and J. Dubuisson, *Characterization of the Envelope Glycoproteins Associated with Infectious Hepatitis C Virus*. *Journal of Virology*, 2010. **84**(19): p. 10159-10168.
138. Drummer, H.E. and P. Pountourios, *Hepatitis C virus glycoprotein E2 contains a membrane-proximal heptad repeat sequence that is essential for E1E2 glycoprotein heterodimerization and viral entry*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(29): p. 30066-72.
139. Weiner, A.J., M.J. Brauer, J. Rosenblatt, K.H. Richman, J. Tung, K. Crawford, F. Bonino, G. Saracco, Q.L. Choo, M. Houghton, and et al., *Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins*. *Virology*, 1991. **180**(2): p. 842-8.
140. Kato, N., M. Hijikata, T. Tanaka, T. Gunji, and K. Shimotohno, *[Hepatitis C virus (HCV)]*. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 1992. **37**(14 Suppl): p. 2626-32.

141. Forns, X., R. Thimme, S. Govindarajan, S.U. Emerson, R.H. Purcell, F.V. Chisari, and J. Bukh, *Hepatitis C virus lacking the hypervariable region 1 of the second envelope protein is infectious and causes acute resolving or persistent infection in chimpanzees*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(24): p. 13318-13323.
142. Bartosch, B., J. Bukh, J.C. Meunier, C. Granier, R.E. Engle, W.C. Blackwelder, S.U. Emerson, F.L. Cosset, and R.H. Purcell, *In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: Evidence for broadly conserved neutralization epitopes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(24): p. 14199-14204.
143. Callens, N., Y. Ciczora, B. Bartosch, N. Vu-Dac, F.L. Cosset, J.M. Pawlotsky, F. Penin, and J. Dubuisson, *Basic residues in hypervariable region 1 of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 contribute to virus entry*. Journal of Virology, 2005. **79**(24): p. 15331-15341.
144. Penin, F., C. Combet, G. Germanidis, P.O. Fraenais, G. Deleage, and J.M. Pawlotsky, *Conservation of the conformation and positive charges of hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein hypervariable region 1 points to a role in cell attachment*. J Virol, 2001. **75**(12): p. 5703-10.
145. Kato, N., *Molecular virology of hepatitis C virus*. Acta Med Okayama, 2001. **55**(3): p. 133-59.
146. McCaffrey, K., I. Boo, P. Pountourios, and H.E. Drummer, *Expression and characterization of a minimal hepatitis C virus glycoprotein E2 core domain that retains CD81 binding*. J Virol, 2007. **81**(17): p. 9584-90.
147. Kong, L., E. Giang, T. Nieusma, R.U. Kadam, K.E. Cogburn, Y. Hua, X. Dai, R.L. Stanfield, D.R. Burton, A.B. Ward, I.A. Wilson, and M. Law, *Hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein core structure*. Science, 2013. **342**(6162): p. 1090-4.
148. Roccasecca, R., H. Ansuini, A. Vitelli, A. Meola, E. Scarselli, S. Acali, M. Pezzanera, B.B. Ercole, J. McKeating, A. Yagnik, A. Lahm, A. Tramontano, R. Cortese, and A. Nicosia, *Binding of the hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 is strain specific and is modulated by a complex interplay between hypervariable regions 1 and 2*. Journal of Virology, 2003. **77**(3): p. 1856-1867.
149. McCaffrey, K., H. Gouklani, I. Boo, P. Pountourios, and H.E. Drummer, *The variable regions of hepatitis C virus glycoprotein E2 have an essential structural role in glycoprotein assembly and virion infectivity*. J Gen Virol, 2011. **92**(Pt 1): p. 112-21.
150. Troesch, M., I. Meunier, P. Lapierre, N. Lapointe, F. Alvarez, M. Boucher, and H. Soudeyins, *Study of a novel hypervariable region in hepatitis C virus (HCV) E2 envelope glycoprotein*. Virology, 2006. **352**(2): p. 357-67.
151. Pileri, P., Y. Uematsu, S. Campagnoli, G. Galli, F. Falugi, R. Petracca, A.J. Weiner, M. Houghton, D. Rosa, G. Grandi, and S. Abrignani, *Binding of hepatitis C virus to CD81*. Science, 1998. **282**(5390): p. 938-941.
152. Scarselli, E., H. Ansuini, R. Cerino, R.M. Roccasecca, S. Acali, G. Filocamo, C. Traboni, A. Nicosia, R. Cortese, and A. Vitelli, *The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus*. Embo Journal, 2002. **21**(19): p. 5017-5025.
153. Krey, T., J. d'Alayer, C.M. Kikuti, A. Saulnier, L. Damier-Piolle, I. Petitpas, D.X. Johansson, R.G. Tawar, B. Baron, B. Robert, P. England, M.A.A. Persson, A. Martin, and F.A. Rey, *The Disulfide Bonds in Glycoprotein E2 of Hepatitis C Virus Reveal the Tertiary Organization of the Molecule*. Plos Pathogens, 2010. **6**(2).
154. Drummer, H.E., I. Boo, A.L. Maerz, and P. Pountourios, *A conserved Gly(436)-Trp-Leu-Ala-Gly-Leu-Phe-Tyr motif in hepatitis C virus glycoprotein E2 is a determinant of CD81 binding and viral entry*. Journal of Virology, 2006. **80**(16): p. 7844-7853.

155. Voisset, C., N. Callens, E. Blanchard, J. Dubuisson, and N. Vu-Dac, *High density lipoproteins facilitate hepatitis C virus entry through the scavenger receptor class B type I*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(9): p. 7793-7799.
156. Khan, A.G., J. Whidby, M.T. Miller, H. Scarborough, A.V. Zatorski, A. Cygan, A.A. Price, S.A. Yost, C.D. Bohannon, J. Jacob, A. Grakoui, and J. Marcotrigiano, *Structure of the core ectodomain of the hepatitis C virus envelope glycoprotein 2*. Nature, 2014. **509**(7500): p. 381-4.
157. Sabahi, A., S.L. Uprichard, W.C. Wimley, S. Dash, and R.F. Garry, *Unexpected structural features of the hepatitis C virus envelope protein 2 ectodomain*. J Virol, 2014. **88**(18): p. 10280-8.
158. Wahid, A., F. Helle, V. Descamps, G. Duverlie, F. Penin, and J. Dubuisson, *Disulfide bonds in hepatitis C virus glycoprotein E1 control the assembly and entry functions of E2 glycoprotein*. J Virol, 2013. **87**(3): p. 1605-17.
159. El Omari, K., O. Iourin, J. Kadlec, G. Sutton, K. Harlos, J.M. Grimes, and D.I. Stuart, *Unexpected structure for the N-terminal domain of hepatitis C virus envelope glycoprotein E1*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 4874.
160. Tello, D., M. Rodriguez-Rodriguez, B. Yelamos, J. Gomez-Gutierrez, S. Ortega, B. Pacheco, D.L. Peterson, and F. Gavilanes, *Expression and structural properties of a chimeric protein based on the ectodomains of E1 and E2 hepatitis C virus envelope glycoproteins*. Protein Expr Purif, 2010. **71**(2): p. 123-31.
161. Tello, D., M. Rodriguez-Rodriguez, B. Yelamos, J. Gomez-Gutierrez, D.L. Peterson, and F. Gavilanes, *High-yield production of a chimeric glycoprotein based on permuted E1 and E2 HCV envelope ectodomains*. J Virol Methods, 2014. **213C**: p. 38-44.
162. Cocquerel, L., J.C. Meunier, A. Op de Beeck, D. Bonte, C. Wychowski, and J. Dubuisson, *Coexpression of hepatitis C virus envelope proteins E1 and E2 in cis improves the stability of membrane insertion of E2*. Journal of General Virology, 2001. **82**: p. 1629-1635.
163. Cocquerel, L., S. Duvet, J.C. Meunier, A. Pillez, R. Cacan, C. Wychowski, and J. Dubuisson, *The transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E1 is a signal for static retention in the endoplasmic reticulum*. J Virol, 1999. **73**(4): p. 2641-9.
164. Cocquerel, L., J.C. Meunier, A. Pillez, C. Wychowski, and J. Dubuisson, *A retention signal necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localization maps to the transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E2*. J Virol, 1998. **72**(3): p. 2183-91.
165. Op De Beeck, A., R. Montserret, S. Duvet, L. Cocquerel, R. Cacan, B. Barberot, M. Le Maire, F. Penin, and J. Dubuisson, *The transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins E1 and E2 play a major role in heterodimerization*. J Biol Chem, 2000. **275**(40): p. 31428-37.
166. Op De Beeck, A., L. Cocquerel, and J. Dubuisson, *Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 11): p. 2589-95.
167. Cocquerel, L., C. Wychowski, F. Minner, F. Penin, and J. Dubuisson, *Charged residues in the transmembrane domains of hepatitis C virus glycoproteins play a major role in the processing, subcellular localization, and assembly of these envelope proteins*. J Virol, 2000. **74**(8): p. 3623-33.
168. Hijikata, M., N. Kato, Y. Ootsuyama, M. Nakagawa, and K. Shimotohno, *Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(13): p. 5547-51.
169. Grakoui, A., C. Wychowski, C. Lin, S.M. Feinstone, and C.M. Rice, *Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products*. J Virol, 1993. **67**(3): p. 1385-95.

170. Mizushima, H., M. Hijikata, S. Asabe, M. Hirota, K. Kimura, and K. Shimotohno, *Two hepatitis C virus glycoprotein E2 products with different C termini*. J Virol, 1994. **68**(10): p. 6215-22.
171. Shalom-Elazari, H., H. Zazrin-Greenspon, H. Shaked, and J.H. Chill, *Global fold and backbone dynamics of the hepatitis C virus E2 glycoprotein transmembrane domain determined by NMR*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 2014. **1838**(11): p. 2919-2928.
172. Zazrin, H., H. Shaked, and J.H. Chill, *Architecture of the hepatitis C virus E1 glycoprotein transmembrane domain studied by NMR*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1838**(3): p. 784-92.
173. Ciczora, Y., N. Callens, F. Penin, E.I. Pecheur, and J. Dubuisson, *Transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins: residues involved in E1E2 heterodimerization and involvement of these domains in virus entry*. J Virol, 2007. **81**(5): p. 2372-81.
174. Jusoh, S.A., C. Welsch, S.W. Siu, R.A. Bockmann, and V. Helms, *Contribution of charged and polar residues for the formation of the E1-E2 heterodimer from Hepatitis C Virus*. J Mol Model, 2010. **16**(10): p. 1625-37.
175. Gavel, Y. and G. Vonheijne, *Sequence Differences between Glycosylated and Nonglycosylated Asn-X-Thr Ser Acceptor Sites - Implications for Protein Engineering*. Protein Engineering, 1990. **3**(5): p. 433-442.
176. Kornfeld, R. and S. Kornfeld, *Assembly of Asparagine-Linked Oligosaccharides*. Annual Review of Biochemistry, 1985. **54**: p. 631-664.
177. Silberstein, S. and R. Gilmore, *Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase*. Faseb Journal, 1996. **10**(8): p. 849-858.
178. Goffard, A. and J. Dubuisson, *Glycosylation of hepatitis C virus envelope proteins*. Biochimie, 2003. **85**(3-4): p. 295-301.
179. Vieyres, G., X. Thomas, V. Descamps, G. Duverlie, A.H. Patel, and J. Dubuisson, *Characterization of the envelope glycoproteins associated with infectious hepatitis C virus*. J Virol, 2010. **84**(19): p. 10159-68.
180. Helenius, A. and M. Aebi, *Intracellular functions of N-linked glycans*. Science, 2001. **291**(5512): p. 2364-2369.
181. Vieyres, G., J. Dubuisson, and T. Pietschmann, *Incorporation of Hepatitis C Virus E1 and E2 Glycoproteins: The Keystones on a Peculiar Virion*. Viruses-Basel, 2014. **6**(3): p. 1149-1187.
182. Goffard, A., N. Callens, B. Bartosch, C. Wychowski, F.L. Cosset, C. Montpellier, and J. Dubuisson, *Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope glycoproteins*. J Virol, 2005. **79**(13): p. 8400-9.
183. Helle, F., G. Vieyres, L. Elkrif, C.I. Popescu, C. Wychowski, V. Descamps, S. Castelain, P. Roingeard, G. Duverlie, and J. Dubuisson, *Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope proteins incorporated into infectious virions*. J Virol, 2010. **84**(22): p. 11905-15.
184. Dahari, H., A. Feliu, M. Garcia-Retortillo, X. Forns, and A.U. Neumann, *Second hepatitis C replication compartment indicated by viral dynamics during liver transplantation*. Journal of Hepatology, 2005. **42**(4): p. 491-498.
185. Ramirez, S., S. Perez-Del-Pulgar, J.A. Carrion, J. Costa, P. Gonzalez, A. Massaguer, C. Fondevila, J.C. Garcia-Valdecasas, M. Navasa, and X. Forns, *Hepatitis C Virus Compartmentalization and Infection Recurrence after Liver Transplantation*. American Journal of Transplantation, 2009. **9**(7): p. 1591-1601.
186. Goutagny, N., A. Fatmi, V. De Ledinghen, F. Penin, P. Couzigou, G. Inchauspe, and C. Bain, *Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection*. Journal of Infectious Diseases, 2003. **187**(12): p. 1951-1958.

187. Forton, D.M., P. Karayiannis, N. Mahmud, S.D. Taylor-Robinson, and H.C. Thomas, *Identification of unique hepatitis C virus quasispecies in the central nervous system and comparative analysis of internal translational efficiency of brain, liver, and serum variants*. Journal of Virology, 2004. **78**(10): p. 5170-5183.
188. Shimizu, Y.K., A. Iwamoto, M. Hijikata, R.H. Purcell, and H. Yoshikura, *Evidence for In-vitro Replication of Hepatitis-C Virus Genome in a Human T-Cell Line*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992. **89**(12): p. 5477-5481.
189. Shimizu, Y.K., R.H. Purcell, and H. Yoshikura, *Correlation between the Infectivity of Hepatitis-C Virus in-Vivo and Its Infectivity in-Vitro*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993. **90**(13): p. 6037-6041.
190. Bertolini, L., S. Iacovacci, A. Ponzetto, G. Gorini, M. Battaglia, and G. Carloni, *The Human Bone-Marrow-Derived B-Cell Line Ce, Susceptible to Hepatitis-C Virus-Infection*. Research in Virology, 1993. **144**(4): p. 281-285.
191. Carloni, G., S. Iacovacci, M. Sargiacomo, G. Ravagnan, A. Ponzetto, C. Peschle, and M. Battaglia, *Susceptibility of Human Liver-Cell Cultures to Hepatitis-C Virus-Infection*. Archives of Virology, 1993: p. 31-39.
192. Cribier, B., C. Schmitt, A. Bingen, A. Kirn, and F. Keller, *In-Vitro Infection of Peripheral-Blood Mononuclear-Cells by Hepatitis-C Virus*. Journal of General Virology, 1995. **76**: p. 2485-2491.
193. Iacovacci, S., M. Sargiacomo, I. Parolini, A. Ponzetto, C. Peschle, and G. Carloni, *Replication and Multiplication of Hepatitis-C Virus Genome in Human Fetal Liver-Cells*. Research in Virology, 1993. **144**(4): p. 275-279.
194. Kato, N., T. Nakazawa, T. Mizutani, and K. Shimotohno, *Susceptibility of Human T-Lymphotropic Virus Type-I Infected Cell-Line Mt-2 to Hepatitis-C Virus-Infection*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1995. **206**(3): p. 863-869.
195. Nakajima, N., M. Hijikata, H. Yoshikura, and Y.K. Shimizu, *Characterization of long-term cultures of hepatitis C virus*. Journal of Virology, 1996. **70**(5): p. 3325-3329.
196. Ikeda, M., N. Kato, T. Mizutani, K. Sugiyama, K. Tanaka, and K. Shimotohno, *Analysis of the cell tropism of HCV by using in vitro HCV-infected human lymphocytes and hepatocytes*. Journal of Hepatology, 1997. **27**(3): p. 445-454.
197. Baumert, T.F., S. Ito, D.T. Wong, and T.J. Liang, *Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells*. Journal of Virology, 1998. **72**(5): p. 3827-3836.
198. Blight, K.J., A.A. Kolykhalov, and C.M. Rice, *Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture*. Science, 2000. **290**(5498): p. 1972-1974.
199. Steinmann, E., C. Brohm, S. Kallis, R. Bartenschlager, and T. Pietschmann, *Efficient trans-encapsidation of hepatitis C virus RNAs into infectious virus-like particles*. Journal of Virology, 2008. **82**(14): p. 7034-7046.
200. Hsu, M., J. Zhang, M. Flint, C. Logvinoff, C. Cheng-Mayer, C.M. Rice, and J.A. McKeating, *Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(12): p. 7271-7276.
201. Steinmann, E. and T. Pietschmann, *Cell Culture Systems for Hepatitis C Virus*. Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy, 2013. **369**: p. 17-48.
202. von Hahn, T. and C.M. Rice, *Hepatitis C virus entry*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(7): p. 3689-3693.
203. Pietschmann, T., V. Lohmann, A. Kaul, N. Krieger, G. Rinck, G. Rutter, D. Strand, and R. Bartenschlager, *Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture*. Journal of Virology, 2002. **76**(8): p. 4008-4021.

204. Pietschmann, T., M. Zayas, P. Meuleman, G. Long, N. Appel, G. Koutsoudakis, S. Kallis, G. Leroux-Roels, V. Lohmann, and R. Bartenschlager, *Production of Infectious Genotype 1b Virus Particles in Cell Culture and Impairment by Replication Enhancing Mutations*. Plos Pathogens, 2009. **5**(6).
205. Suzuki, R., K. Saito, T. Kato, M. Shirakura, D. Akazawa, K. Ishii, H. Aizaki, Y. Kanegae, Y. Matsuura, I. Saito, T. Wakita, and T. Suzuki, *Trans-complemented hepatitis C virus particles as a versatile tool for study of virus assembly and infection*. Virology, 2012. **432**(1): p. 29-38.
206. Kato, T., T. Date, M. Miyamoto, A. Furusaka, K. Tokushige, M. Mizokami, and T. Wakita, *Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon*. Gastroenterology, 2003. **125**(6): p. 1808-1817.
207. Daneker, G.W., S.A. Lund, S.W. Caughman, R.A. Swerlick, A.H. Fischer, C.A. Staley, and E.W. Ades, *Culture and characterization of sinusoidal endothelial cells isolated from human liver*. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 1998. **34**(5): p. 370-377.
208. Cormier, E.G., R.J. Durso, F. Tsamis, L. Boussemart, C. Manix, W.C. Olson, J.P. Gardner, and T. Dragic, *L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (0209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(39): p. 14067-14072.
209. Lozach, P.Y., A. Amara, B. Bartosch, J.L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, F.L. Cosset, and R. Altmeyer, *C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(31): p. 32035-32045.
210. Barth, H., C. Schafer, M.I. Adah, F.M. Zhang, R.J. Linhardt, H. Toyoda, A. Kinoshita-Toyoda, T. Toida, T.H. van Kuppevelt, E. Depla, F. von Weizsacker, H.E. Blum, and T.F. Baumert, *Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(42): p. 41003-41012.
211. Barth, H., E.K. Schnober, F. Zhang, R.J. Linhardt, E. Depla, B. Boson, F.L. Cosset, A.H. Patel, H.E. Blum, and T.F. Baumert, *Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction*. Journal of Virology, 2006. **80**(21): p. 10579-10590.
212. Koutsoudakis, G., A. Kaul, E. Steinmann, S. Kallis, V. Lohmann, T. Pietschmann, and R. Bartenschlager, *Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses*. Journal of Virology, 2006. **80**(11): p. 5308-5320.
213. Andre, P., G. Perlemuter, A. Budkowska, C. Brechot, and V. Lotteau, *Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism*. Seminars in Liver Disease, 2005. **25**(1): p. 93-104.
214. Thomssen, R., S. Bonk, C. Propfe, K.H. Heermann, H.G. Kochel, and A. Uy, *Association of Hepatitis-C Virus in Human Sera with Beta-Lipoprotein*. Medical Microbiology and Immunology, 1992. **181**(5): p. 293-300.
215. Evans, M.J., T. von Hahn, D.M. Tscherne, A.J. Syder, M. Panis, B. Wolk, T. Hatzioannou, J.A. McKeating, P.D. Bieniasz, and C.M. Rice, *Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry*. Nature, 2007. **446**(7137): p. 801-805.
216. Benedicto, I., F. Molina-Jimenez, B. Bartosch, F.L. Cosset, D. Lavillette, J. Prieto, R. Moreno-Otero, A. Valenzuela-Fernandez, R. Aldabe, M. Lopez-Cabrera, and P.L. Majano, *The Tight Junction-Associated Protein Occludin Is Required for a Postbinding Step in Hepatitis C Virus Entry and Infection*. Journal of Virology, 2009. **83**(16): p. 8012-8020.
217. Lupberger, J., M.B. Zeisel, F. Xiao, C. Thumann, I. Fofana, L. Zona, C. Davis, C.J. Mee, M. Turek, S. Gorke, C. Royer, B. Fischer, M.N. Zahid, D. Lavillette, J. Fresquet, F.L. Cosset, S.M. Rothenberg, T. Pietschmann, A.H. Patel, P. Pessaux, M. Doffoel, W. Raffelsberger,

- O. Poch, J.A. McKeating, L. Brino, and T.F. Baumert, *EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy*. *Nature Medicine*, 2011. **17**(5): p. 589-U109.
218. Sainz, B., N. Barretto, D.N. Martin, N. Hiraga, M. Imamura, S. Hussain, K.A. Marsh, X.M. Yu, K. Chayama, W.A. Alrefai, and S.L. Uprichard, *Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor*. *Nature Medicine*, 2012. **18**(2): p. 281-285.
 219. Bartosch, B. and F.L. Cosset, *Cell entry of hepatitis C virus*. *Virology*, 2006. **348**(1): p. 1-12.
 220. Cocquerel, L., C. Voisset, and J. Dubuisson, *Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions*. *Journal of General Virology*, 2006. **87**: p. 1075-1084.
 221. Schaefer, E.A.K. and R.T. Chung, *HCV and Host Lipids: An Intimate Connection*. *Seminars in Liver Disease*, 2013. **33**(4): p. 358-368.
 222. Blanchard, E., S. Belouzard, L. Goueslain, T. Wakita, J. Dubuisson, C. Wychowski, and Y. Rouille, *Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis*. *Journal of Virology*, 2006. **80**(14): p. 6964-6972.
 223. Lavillette, D., B. Bartosch, D. Nourrisson, G. Verney, F.L. Cosset, F. Penin, and E.I. Pecheur, *Hepatitis C virus glycoproteins mediate low pH-dependent membrane fusion with liposomes*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(7): p. 3909-17.
 224. Nielsen, S.U., M.F. Bassendine, A.D. Burt, C. Martin, W. Pumeechockchai, and G.L. Toms, *Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients*. *Journal of Virology*, 2006. **80**(5): p. 2418-2428.
 225. Counihan, N.A., S.M. Rawlinson, and B.D. Lindenbach, *Trafficking of Hepatitis C Virus Core Protein during Virus Particle Assembly*. *Plos Pathogens*, 2011. **7**(10).
 226. Chang, K.S., J.Y. Jiang, Z.H. Cai, and G.X. Luo, *Human apolipoprotein E is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture*. *Journal of Virology*, 2007. **81**(24): p. 13783-13793.
 227. Gastaminza, P., G.F. Cheng, S. Wieland, J. Zhong, W. Liao, and F.V. Chisari, *Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion*. *Journal of Virology*, 2008. **82**(5): p. 2120-2129.
 228. Huang, H., F. Sun, D.M. Owen, W.P. Li, Y. Chen, M. Gale, and J. Ye, *Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007. **104**(14): p. 5848-5853.
 229. Barth, H., *Insights into the role of interferon lambda in hepatitis C virus infection*. *Journal of Hepatology*, 2011. **54**(5): p. 844-847.
 230. Germi, R., J.M. Crance, D. Garin, J. Guimet, H. Lortat-Jacob, R.W.H. Ruigrok, J.P. Zarski, and E. Drouet, *Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption*. *Journal of Medical Virology*, 2002. **68**(2): p. 206-215.
 231. Akazawa, D., T. Date, K. Morikawa, A. Murayama, M. Miyamoto, M. Kaga, H. Barth, T.F. Baumert, J. Dubuisson, and T. Wakita, *CD81 expression is important for the permissiveness of Huh7 cell clones for heterogeneous hepatitis C virus infection*. *Journal of Virology*, 2007. **81**(10): p. 5036-5045.
 232. Kapadia, S.B., H. Barth, T. Baumert, J.A. McKeating, and F.V. Chisari, *Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I*. *Journal of Virology*, 2007. **81**(1): p. 374-383.
 233. Pohlmann, S., J. Zhang, F. Baribaud, Z.W. Chen, G. Leslie, G. Lin, A. Granelli-Piperno, R.W. Dom, C.M. Rice, and J.A. McKeating, *Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR*. *Journal of Virology*, 2003. **77**(7): p. 4070-4080.

234. Gardner, J.P., R.J. Durso, R.R. Arrigale, G.P. Donovan, P.J. Maddon, T. Dragic, and W.C. Olson, *L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(8): p. 4498-4503.
235. Brazzoli, M., A. Bianchi, S. Filippini, A. Weiner, Q. Zhu, M. Pizza, and S. Crotta, *CD81 is a central regulator of cellular events required for hepatitis C virus infection of human hepatocytes*. Journal of Virology, 2008. **82**(17): p. 8316-8329.
236. Sharma, N.R., G. Mateu, M. Dreux, A. Grakoui, F.L. Cosset, and G.B. Melikyan, *Hepatitis C Virus Is Primed by CD81 Protein for Low pH-dependent Fusion*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(35): p. 30361-30376.
237. Rhainds, D. and L. Brissette, *The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking - Defining the rules for lipid traders*. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2004. **36**(1): p. 39-77.
238. Acton, S.L., P.E. Scherer, H.F. Lodish, and M. Krieger, *Expression Cloning of Sr-BI, a Cd36-Related Class-B Scavenger Receptor*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(33): p. 21003-21009.
239. Krieger, M., *Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems*. Journal of Clinical Investigation, 2001. **108**(6): p. 793-797.
240. Calvo, D. and M.A. Vega, *Identification, Primary Structure, and Distribution of Cla-1, a Novel Member of the Cd36/Limpii Gene Family*. Journal of Biological Chemistry, 1993. **268**(25): p. 18929-18935.
241. Van Eck, M., M. Hoekstra, R. Out, I.S.T. Bos, J.K. Kruijt, R.B. Hildebrand, and T.J.C. Van Berkel, *Scavenger receptor BI facilitates the metabolism of VLDL lipoproteins in vivo*. Journal of Lipid Research, 2008. **49**(1): p. 136-146.
242. Bartosch, B., A. Vitelli, C. Granier, C. Goujon, J. Dubuisson, S. Pascale, E. Scarselli, R. Cortese, A. Nicosia, and F.L. Cosset, *Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(43): p. 41624-41630.
243. Dreux, M., T. Pietschmann, C. Granier, C. Voisset, S. Ricard-Blum, P.E. Mangeot, Z. Keck, S. Fong, N. Vu-Dac, J. Dubuisson, R. Bartenschlager, D. Lavillette, and F.L. Cosset, *High density lipoprotein inhibits hepatitis C virus-neutralizing antibodies by stimulating cell entry via activation of the scavenger receptor BI*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(27): p. 18285-18295.
244. Bartosch, B., G. Verney, M. Dreux, P. Donot, Y. Morice, F. Penin, J.M. Pawlotsky, D. Lavillette, and F.L. Cosset, *An interplay between hypervariable region 1 of the Hepatitis C Virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies*. Journal of Virology, 2005. **79**(13): p. 8217-8229.
245. Maillard, P., T. Huby, U. Andreo, M. Moreau, J. Chapman, and A. Budkowska, *The interaction of natural hepatitis C virus with human scavenger receptor SR-BI/Cla1 is mediated by ApoB-containing lipoproteins*. FASEB Journal, 2006. **20**(2): p. 735-+.
246. Rychlowska, M., A.M. Owsianka, S.K. Fong, J. Dubuisson, K. Bienkowska-Szewczyk, and A.H. Patel, *Comprehensive linker-scanning mutagenesis of the hepatitis C virus E1 and E2 envelope glycoproteins reveals new structure-function relationships*. J Gen Virol, 2011. **92**(Pt 10): p. 2249-61.
247. Feneant, L., S. Levy, and L. Cocquerel, *CD81 and hepatitis C virus (HCV) infection*. Viruses, 2014. **6**(2): p. 535-72.
248. Dreux, M., V.L.D. Thi, J. Fresquet, M. Guerin, Z. Julia, G. Verney, D. Durantel, F. Zoulim, D. Lavillette, F.L. Cosset, and B. Bartosch, *Receptor Complementation and Mutagenesis*

- Reveal SR-BI as an Essential HCV Entry Factor and Functionally Imply Its Intra- and Extra-Cellular Domains.* Plos Pathogens, 2009. **5**(2).
249. Ploss, A., M.J. Evans, V.A. Gaysinskaya, M. Panis, H.N. You, Y.P. de Jong, and C.M. Rice, *Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells.* Nature, 2009. **457**(7231): p. 882-886.
 250. Zhang, J., G. Randall, A. Higginbottom, P. Monk, C.M. Rice, and J.A. McKeating, *CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection.* J Virol, 2004. **78**(3): p. 1448-55.
 251. Shin, K., V.C. Fogg, and B. Margolis, *Tight junctions and cell polarity.* Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2006. **22**: p. 207-235.
 252. Benedicto, I., F. Molina-Jimenez, O. Barreiro, A. Madonado-Rodriguez, J. Prieto, R. Moreno-Otero, R. Aldabe, M. Lopez-Cabrera, and P.L. Majano, *Hepatitis C virus envelope components alter localization of hepatocyte tight junction-associated proteins and promote occludin retention in the endoplasmic reticulum.* Hepatology, 2008. **48**(4): p. 1044-1053.
 253. Furuse, M., H. Sasaki, K. Fujimoto, and S. Tsukita, *A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts.* Journal of Cell Biology, 1998. **143**(2): p. 391-401.
 254. Van Itallie, C.M. and J.M. Anderson, *Claudins and epithelial paracellular transport.* Annual Review of Physiology, 2006. **68**: p. 403-429.
 255. Rocha-Perugini, V., C. Montpellier, D. Delgrange, C. Wychowski, F. Helle, A. Pillez, H. Drobecq, F. Le Naour, S. Charrin, S. Levy, E. Rubinstein, J. Dubuisson, and L. Cocquerel, *The CD81 Partner EWI-2wint Inhibits Hepatitis C Virus Entry.* Plos One, 2008. **3**(4).
 256. Zeisel, M.B., G. Koutsoudakis, E.K. Schnober, A. Haberstroh, H.E. Blum, F.L. Cosset, T. Wakita, D. Jaeck, M. Doffoel, C. Royer, E. Soulier, E. Schvoerer, C. Schuster, F. Stoll-Keller, R. Bartenschlager, T. Pietschmann, H. Barth, and T.F. Baumert, *Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81.* Hepatology, 2007. **46**(6): p. 1722-1731.
 257. von Hahn, T., B.D. Lindenbach, A. Boullier, O. Quehenberger, M. Paulson, C.M. Rice, and J.A. McKeating, *Oxidized low-density lipoprotein inhibits hepatitis C virus cell entry in human hepatoma cells.* Hepatology, 2006. **43**(5): p. 932-942.
 258. Coyne, C.B. and J.M. Bergelson, *Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions.* Cell, 2006. **124**(1): p. 119-131.
 259. Yang, W., C. Qiu, N. Biswas, J. Jin, S.C. Watkins, R.C. Montelaro, C.B. Coyne, and T.Y. Wang, *Correlation of the tight junction-like distribution of Claudin-1 to the cellular tropism of hepatitis C virus.* Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(13): p. 8643-8653.
 260. Liu, S.F., W. Yang, L. Shen, J.R. Turner, C.B. Coyne, and T.Y. Wang, *Tight Junction Proteins Claudin-1 and Occludin Control Hepatitis C Virus Entry and Are Downregulated during Infection To Prevent Superinfection.* Journal of Virology, 2009. **83**(4): p. 2011-2014.
 261. Cukierman, L., L. Meertens, C. Bertaux, F. Kajumo, and T. Dragic, *Residues in a Highly Conserved Claudin-1 Motif Are Required for Hepatitis C Virus Entry and Mediate the Formation of Cell-Cell Contacts.* Journal of Virology, 2009. **83**(11): p. 5477-5484.
 262. Farquhar, M.J., H.J. Harris, M. Diskar, S. Jones, C.J. Mee, S.U. Nielsen, C.L. Brimacombe, S. Molina, G.L. Toms, P. Maurel, J. Howl, F.W. Herberg, S.C.D. van Ijzendoorn, P. Balfe, and J.A. McKeating, *Protein kinase A-dependent step(s) in hepatitis C virus entry and infectivity.* Journal of Virology, 2008. **82**(17): p. 8797-8811.
 263. Harris, H.J., M.J. Farquhar, C.J. Mee, C. Davis, G.M. Reynolds, A. Jennings, K. Hu, F. Yuan, H. Deng, S.G. Hubscher, J.H. Han, P. Balfe, and J.A. McKeating, *CD81 and claudin*

- 1 coreceptor association: Role in hepatitis C virus entry.* Journal of Virology, 2008. **82**(10): p. 5007-5020.
264. Si, Y.H., S.F. Liu, X.Y. Liu, J.L. Jacobs, M. Cheng, Y.Q. Niu, Q. Jin, T.Y. Wang, and W. Yang, *A human claudin-1-derived peptide inhibits hepatitis C virus entry.* Hepatology, 2012. **56**(2): p. 507-515.
265. Furuse, M., T. Hirase, M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura, S. Tsukita, and S. Tsukita, *Occludin - a Novel Integral Membrane-Protein Localizing at Tight Junctions.* Journal of Cell Biology, 1993. **123**(6): p. 1777-1788.
266. Liu, S.F., W. Kuo, W. Yang, W.Q. Liu, G.A. Gibson, K. Dorko, S.C. Watkins, S.C. Strom, and T.Y. Wang, *The second extracellular loop dictates Occludin-mediated HCV entry.* Virology, 2010. **407**(1): p. 160-170.
267. Collier, K.E., K.L. Berger, N.S. Heaton, J.D. Cooper, R. Yoon, and G. Randall, *RNA Interference and Single Particle Tracking Analysis of Hepatitis C Virus Endocytosis.* Plos Pathogens, 2009. **5**(12).
268. Altmann, S.W., H.R. Davis, L.J. Zhu, X.R. Yao, L.M. Hoos, G. Tetzloff, S.P.N. Iyer, M. Maguire, A. Golovko, M. Zeng, L.Q. Wang, N. Murgolo, and M.P. Graziano, *Niemann-Pick C1 like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption.* Science, 2004. **303**(5661): p. 1201-1204.
269. Yu, L.Q., *The structure and function of Niemann-Pick C1-like 1 protein.* Current Opinion in Lipidology, 2008. **19**(3): p. 263-269.
270. Garcia-Calvo, M., J.M. Lisnock, H.G. Bull, B.E. Hawes, D.A. Burnett, M.P. Braun, J.H. Crona, H.R. Davis, D.C. Dean, P.A. Detmers, M.P. Graziano, M. Hughes, D.E. MacIntyre, A. Ogawa, K.A. O'Neill, S.P.N. Iyer, D.E. Shevell, M.M. Smith, Y.S. Tang, A.M. Makarewicz, F. Ujjainwalla, S.W. Altmann, K.T. Chapman, and N.A. Thornberry, *The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1).* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(23): p. 8132-8137.
271. Gupta, E.K. and M.K. Ito, *Ezetimibe: the first in a novel class of selective cholesterol-absorption inhibitors.* Heart Dis, 2002. **4**(6): p. 399-409.
272. Codran, A., C. Royer, D. Jaeck, M. Bastien-Valle, T.F. Baumert, M.P. Kieny, C.A. Pereira, and J.P. Martin, *Entry of hepatitis C virus pseudotypes into primary human hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis.* Journal of General Virology, 2006. **87**: p. 2583-2593.
273. Meertens, L., C. Bertaux, and T. Dragic, *Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles.* Journal of Virology, 2006. **80**(23): p. 11571-11578.
274. Schwarz, A.K., J. Grove, K. Hu, C.J. Mee, P. Balfe, and J.A. McKeating, *Hepatoma Cell Density Promotes Claudin-1 and Scavenger Receptor BI Expression and Hepatitis C Virus Internalization.* Journal of Virology, 2009. **83**(23): p. 12407-12414.
275. Farquhar, M.J., K. Hu, H.J. Harris, C. Davis, C.L. Brimacombe, S.J. Fletcher, T.F. Baumert, J.Z. Rappoport, P. Balfe, and J.A. McKeating, *Hepatitis C Virus Induces CD81 and Claudin-1 Endocytosis.* Journal of Virology, 2012. **86**(8): p. 4305-4316.
276. Tscherne, D.M., C.T. Jones, M.J. Evans, B.D. Lindenbach, J.A. McKeating, and C.M. Rice, *Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry.* Journal of Virology, 2006. **80**(4): p. 1734-1741.
277. Boo, I., K. teWierik, F. Douam, D. Lavillette, P. Poubourios, and H.E. Drummer, *Distinct roles in folding, CD81 receptor binding and viral entry for conserved histidine residues of hepatitis C virus glycoprotein E1 and E2.* Biochem J, 2012. **443**(1): p. 85-94.
278. Haid, S., T. Pietschmann, and E.I. Pecheur, *Low pH-dependent hepatitis C virus membrane fusion depends on E2 integrity, target lipid composition, and density of virus particles.* J Biol Chem, 2009. **284**(26): p. 17657-67.

279. Lescar, J., A. Roussel, M.W. Wien, J. Navaza, S.D. Fuller, G. Wengler, G. Wengler, and F.A. Rey, *The fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: An icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH*. Cell, 2001. **105**(1): p. 137-148.
280. Yagnik, A.T., A. Lahm, A. Meola, R.M. Roccasecca, B.B. Ercole, A. Nicosia, and A. Tramontano, *A model for the hepatitis C virus envelope glycoprotein E2*. Proteins-Structure Function and Genetics, 2000. **40**(3): p. 355-366.
281. Pacheco, B., J. Gomez-Gutierrez, B. Yelamos, C. Delgado, F. Roncal, J.P. Albar, D. Peterson, and F. Gavilanes, *Membrane-perturbing properties of three peptides corresponding to the ectodomain of hepatitis C virus E2 envelope protein*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1758**(6): p. 755-63.
282. Ciccaglione, A.R., A. Costantino, C. Marcantonio, M. Equestre, A. Geraci, and M. Rapicetta, *Mutagenesis of hepatitis C virus E1 protein affects its membrane-permeabilizing activity*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 9): p. 2243-50.
283. Lavillette, D., E.I. Pecheur, P. Donot, J. Fresquet, J. Molle, R. Corbau, M. Dreux, F. Penin, and F.L. Cosset, *Characterization of fusion determinants points to the involvement of three discrete regions of both E1 and E2 glycoproteins in the membrane fusion process of hepatitis C virus*. J Virol, 2007. **81**(16): p. 8752-65.
284. Perez-Berna, A.J., M.R. Moreno, J. Guillen, A. Bernabeu, and J. Villalain, *The membrane-active regions of the hepatitis C virus E1 and E2 envelope glycoproteins*. Biochemistry, 2006. **45**(11): p. 3755-68.
285. Perez-Berna, A.J., G. Pabst, P. Laggner, and J. Villalain, *Biophysical characterization of the fusogenic region of HCV envelope glycoprotein E1*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1788**(10): p. 2183-93.
286. Tello, D., M. Rodriguez-Rodriguez, S. Ortega, L. Lombana, B. Yelamos, J. Gomez-Gutierrez, D.L. Peterson, and F. Gavilanes, *Fusogenic properties of the ectodomains of hepatitis C virus envelope proteins*. Febs Journal, 2014. **281**(11): p. 2558-2569.
287. Albecka, A., R. Montserret, T. Krey, A.W. Tarr, E. Diesis, J.K. Ball, V. Descamps, G. Duverlie, F. Rey, F. Penin, and J. Dubuisson, *Identification of new functional regions in hepatitis C virus envelope glycoprotein E2*. J Virol, 2011. **85**(4): p. 1777-92.
288. Aizaki, H., K. Morikawa, M. Fukasawa, H. Hara, Y. Inoue, H. Tani, K. Saito, M. Nishijima, K. Hanada, Y. Matsuura, M.A.C. Lai, T. Miyamura, T. Wakita, and T. Suzuki, *Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection*. Journal of Virology, 2008. **82**(12): p. 5715-5724.
289. Alvisi, G., V. Madan, and R. Bartenschlager, *Hepatitis C virus and host cell lipids: an intimate connection*. RNA Biol, 2011. **8**(2): p. 258-69.
290. Gretton, S.N., A.I. Taylor, and J. McLauchlan, *Mobility of the hepatitis C virus NS4B protein on the endoplasmic reticulum membrane and membrane-associated foci*. Journal of General Virology, 2005. **86**: p. 1415-1421.
291. Bartenschlager, R., M. Frese, and T. Pietschmann, *Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence*. Advances in Virus Research, Vol. 63, 2004. **63**: p. 71-+.
292. Kapadia, S.B. and F.V. Chisari, *Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(7): p. 2561-2566.
293. Randall, G., M. Panis, J.D. Cooper, T.L. Tellinghuisen, K.E. Sukhodolets, S. Pfeffer, M. Landthaler, P. Landgraf, S. Kan, B.D. Lindenbach, M. Chien, D.B. Weir, J.J. Russo, J. Ju, M.J. Brownstein, R. Sheridan, C. Sander, M. Zavolan, T. Tuschl, and C.M. Rice, *Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(31): p. 12884-12889.
294. Reiss, S., I. Rebhan, P. Backes, I. Romero-Brey, T. Longerich, P. Schirmacher, R. Bartenschlager, and V. Lohmann, *Recruitment and Activation of a Lipid Kinase by Ns5a*

- of the Hepatitis C Virus Is Essential for the Integrity of the Membranous Replication Compartment*. Journal of Hepatology, 2011. **54**: p. S19-S19.
295. Tai, A.W., Y. Benita, L.F. Peng, S.S. Kim, N. Sakamoto, R.J. Xavier, and R.T. Chung, *A Functional Genomic Screen Identifies Cellular Cofactors of Hepatitis C Virus Replication*. Cell Host & Microbe, 2009. **5**(3): p. 298-307.
296. Berger, K.L., J.D. Cooper, N.S. Heaton, R. Yoon, T.E. Oakland, T.X. Jordan, G. Mateu, A. Grakoui, and G. Randall, *Roles for endocytic trafficking and phosphatidylinositol 4-kinase III alpha in hepatitis C virus replication*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009. **106**(18): p. 7577-7582.
297. Trotard, M., C. Lepere-Douard, M. Regeard, C. Piquet-Pellorce, D. Lavillette, F.L. Cosset, P. Gripon, and J. Le Seyec, *Kinases required in hepatitis C virus entry and replication highlighted by small interference RNA screening*. Faseb Journal, 2009. **23**(11): p. 3780-3789.
298. Goueslain, L., K. Alsaleh, P. Horellou, P. Roingeard, V. Descamps, G. Duverlie, Y. Ciczora, C. Wychowski, J. Dubuisson, and Y. Rouille, *Identification of GBF1 as a Cellular Factor Required for Hepatitis C Virus RNA Replication*. Journal of Virology, 2010. **84**(2): p. 773-787.
299. Lai, C.K., K.S. Jeng, K. Machida, and M.M.C. Lai, *Association of hepatitis C virus replication complexes with microtubules and actin filaments is dependent on the interaction of NS3 and NS5A*. Journal of Virology, 2008. **82**(17): p. 8838-8848.
300. Appel, N., T. Schaller, F. Penin, and R. Bartenschlager, *From structure to function: New insights into hepatitis C virus RNA replication*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(15): p. 9833-9836.
301. Boulant, S., M.W. Douglas, L. Moody, A. Budkowska, P. Targett-Adams, and J. McLauchlan, *Hepatitis C virus core protein induces lipid droplet redistribution in a microtubule- and dynein-dependent manner*. Traffic, 2008. **9**(8): p. 1268-1282.
302. Targett-Adams, P., S. Boulant, and J. McLauchlan, *Visualization of double-stranded RNA in cells supporting hepatitis C virus RNA replication*. Journal of Virology, 2008. **82**(5): p. 2182-2195.
303. Lyn, R.K., D.C. Kennedy, A. Stelow, A. Ridsdale, and J.P. Pezacki, *Dynamics of lipid droplets induced by the hepatitis C virus core protein*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010. **399**(4): p. 518-524.
304. Bartenschlager, R., F. Penin, V. Lohmann, and P. Andre, *Assembly of infectious hepatitis C virus particles*. Trends in Microbiology, 2011. **19**(2): p. 95-103.
305. Klein, K.C., S.R. Dellos, and J.R. Lingappa, *Identification of residues in the hepatitis C virus core protein that are critical for capsid assembly in a cell-free system (vol 79, pg 6814, 2005)*. Journal of Virology, 2005. **79**(15): p. 10098-10098.
306. Klein, K.C., S.J. Polyak, and J.R. Lingappa, *Unique features of hepatitis C virus capsid formation revealed by de novo cell-free assembly*. Journal of Virology, 2004. **78**(17): p. 9257-9269.
307. Kunkel, M., M. Lorinczi, R. Rijnbrand, S.M. Lemon, and S.J. Watowich, *Self-assembly of nucleocapsid-like particles from recombinant hepatitis C virus core protein*. Journal of Virology, 2001. **75**(5): p. 2119-2129.
308. Majeau, N., V. Gagne, A. Boivin, M. Bolduc, J.A. Majeau, D. Ouellet, and D. Leclerc, *The N-terminal half of the core protein of hepatitis C virus is sufficient for nucleocapsid formation*. Journal of General Virology, 2004. **85**: p. 971-981.
309. Boulant, S., R. Montserret, R.G. Hope, M. Ratnier, P. Targett-Adams, J.P. Laverne, F. Penin, and J. McLauchlan, *Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(31): p. 22236-22247.

310. Hope, R.G., D.J. Murphy, and J. McLauchlan, *The domains required to direct core proteins of hepatitis C virus and GB virus-B to lipid droplets share common features with plant oleosin proteins*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(6): p. 4261-4270.
311. Phan, T., R.K.F. Beran, C. Peters, I.C. Lorenz, and B.D. Lindenbach, *Hepatitis C Virus NS2 Protein Contributes to Virus Particle Assembly via Opposing Epistatic Interactions with the E1-E2 Glycoprotein and NS3-NS4A Enzyme Complexes*. Journal of Virology, 2009. **83**(17): p. 8379-8395.
312. Yi, M.K., Y.H. Ma, J. Yates, and S.M. Lemon, *trans-Complementation of an NS2 Defect in a Late Step in Hepatitis C Virus (HCV) Particle Assembly and Maturation*. Plos Pathogens, 2009. **5**(5).
313. Afdhal, N.H., *The natural history of hepatitis C*. Seminars in Liver Disease, 2004. **24**: p. 3-8.
314. Haller, O. and F. Weber, *Pathogenic viruses: Smart manipulators of the interferon system*. Interferon: The 50th Anniversary, 2007. **316**: p. 315-334.
315. Meylan, E., J. Curran, K. Hofmann, D. Moradpour, M. Binder, R. Bartenschlager, and R. Tschoopp, *Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus*. Nature, 2005. **437**(7062): p. 1167-1172.
316. Li, K., E. Foy, J.C. Ferreón, M. Nakamura, A.C.M. Ferreón, M. Ikeda, S.C. Ray, M. Gale, and S.M. Lemon, *Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(8): p. 2992-2997.
317. Garaigorta, U. and F.V. Chisari, *Hepatitis C Virus Blocks Interferon Effector Function by Inducing Protein Kinase R Phosphorylation*. Cell Host & Microbe, 2009. **6**(6): p. 513-522.
318. Ge, D.L., J. Fellay, A.J. Thompson, J.S. Simon, K.V. Shianna, T.J. Urban, E.L. Heinzen, P. Qiu, A.H. Bertelsen, A.J. Muir, M. Sulkowski, J.G. McHutchison, and D.B. Goldstein, *Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance*. Nature, 2009. **461**(7262): p. 399-401.
319. Suppiah, V., M. Moldovan, G. Ahlenstiel, T. Berg, M. Weltman, M.L. Abate, M. Bassendine, U. Spengler, G.J. Dore, E. Powell, S. Riordan, D. Sheridan, A. Smedile, V. Fragomeli, T. Muller, M. Bahlo, G.J. Stewart, D.R. Booth, J. George, and H.C. Study, *IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy*. Nature Genetics, 2009. **41**(10): p. 1100-U74.
320. Tanaka, Y., N. Nishida, M. Sugiyama, M. Kurosaki, K. Matsuura, N. Sakamoto, M. Nakagawa, M. Korenaga, K. Hino, S. Hige, Y. Ito, E. Mita, E. Tanaka, S. Mochida, Y. Murawaki, M. Honda, A. Sakai, Y. Hiasa, S. Nishiguchi, A. Koike, I. Sakaida, M. Imamura, K. Ito, K. Yano, N. Masaki, F. Sugauchi, N. Izumi, K. Tokunaga, and M. Mizokami, *Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C*. Nature Genetics, 2009. **41**(10): p. 1105-U81.
321. Thomas, D.L., C.L. Thio, M.P. Martin, Y. Qi, D. Ge, C. O'hUigin, J. Kidd, K. Kidd, S.I. Khakoo, G. Alexander, J.J. Goedert, G.D. Kirk, S.M. Donfield, H.R. Rosen, L.H. Tobler, M.P. Busch, J.G. McHutchison, D.B. Goldstein, and M. Carrington, *Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus*. Nature, 2009. **461**(7265): p. 798-U52.
322. Thimme, R., K.M. Chang, J. Pemberton, A. Sette, and F.V. Chisari, *Degenerate immunogenicity of an HLA-A2-restricted hepatitis B virus nucleocapsid cytotoxic T-lymphocyte epitope that is also presented by HLA-B51*. Journal of Virology, 2001. **75**(8): p. 3984-3987.
323. Klenerman, P. and A. Hill, *T cells and viral persistence: lessons from diverse infections*. Nature Immunology, 2005. **6**(9): p. 873-879.

324. Shoukry, N.H., A. Grakoui, M. Houghton, D.Y. Chien, J. Ghayeb, K.A. Reimann, and C.M. Walker, *Memory CD8(+) T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection*. Journal of Experimental Medicine, 2003. **197**(12): p. 1645-1655.
325. McKiernan, S.M., R. Hagan, M. Curry, G.S.A. McDonald, A. Kelly, N. Nolan, A. Walsh, J. Hegarty, E. Lawlor, and D. Kelleher, *Distinct MHC class I and II alleles are associated with hepatitis C viral clearance, originating from a single source*. Hepatology, 2004. **40**(1): p. 108-114.
326. Neumann-Haefelin, C., T. Killinger, J. Timm, S. Southwood, D. McKinney, H.E. Blum, and R. Thimme, *Absence of viral escape within a frequently recognized HLA-A26-restricted CD8(+) T-cell epitope targeting the functionally constrained hepatitis C virus NS5A/5B cleavage site*. Journal of General Virology, 2007. **88**: p. 1986-1991.
327. Bowen, D.G. and C.M. Walker, *Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection*. Nature, 2005. **436**(7053): p. 946-952.
328. Lauer, G.M., E. Barnes, M. Lucas, J. Timm, K. Ouchi, A.Y. Kim, C.L. Day, G.K. Robbins, D.R. Casson, M. Reiser, G. Dusheiko, T.M. Allen, R.T. Chung, B.D. Walker, and P. Klenerman, *High resolution analysis of cellular immune responses in resolved and persistent hepatitis C virus infection*. Gastroenterology, 2004. **127**(3): p. 924-936.
329. Schmilovitzweiss, H., M. Levy, N. Thompson, and G. Dusheiko, *Viral Markers in the Treatment of Hepatitis-B and Hepatitis-C*. Gut, 1993. **34**(2): p. S26-S35.
330. Pestka, J.M., M.B. Zeisel, E. Blaser, P. Schurmann, B. Bartosch, F.L. Cosset, A.H. Patel, H. Meisel, J. Baumert, S. Viazov, K. Rispeter, H.E. Blum, M. Roggendorf, and T.F. Baumert, *Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(14): p. 6025-6030.
331. Timpe, J.M., Z. Stamataki, A. Jennings, K. Hu, M.J. Farquhar, H.J. Harris, A. Schwarz, I. Desombere, G.L. Roels, P. Bafe, and J.A. McKeating, *Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies*. Hepatology, 2008. **47**(1): p. 17-24.
332. Zhang, P., L.L. Zhong, E.B. Struble, H. Watanabe, A. Kachko, K. Mihalik, M.L. Virata-Theimer, H.J. Alter, S. Feinstone, and M. Major, *Depletion of interfering antibodies in chronic hepatitis C patients and vaccinated chimpanzees reveals broad cross-genotype neutralizing activity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009. **106**(18): p. 7537-7541.
333. Helle, F., A. Goffard, V. Morel, G. Duverlie, J. McKeating, Z.Y. Keck, S. Foug, F. Penin, J. Dubuisson, and C. Voisset, *The neutralizing activity of anti-hepatitis C virus antibodies is modulated by specific glycans on the E2 envelope protein*. Journal of Virology, 2007. **81**(15): p. 8101-8111.
334. Eisenstein, M., *A moving target*. Nature, 2011. **474**(7350): p. S16-S17.
335. Kodama, Y. and C.D. Hu, *An improved bimolecular fluorescence complementation assay with a high signal-to-noise ratio*. Biotechniques, 2010. **49**(5): p. 793-+.
336. Hochuli, E. and H. Dobeli, *Alpha-Alkyl Nitrilotriacetic Acid Adsorbents, a New Type of Metal Chelating Gel Selective for Proteins with Neighboring Histidine-Residues*. Biological Chemistry Hoppe-Seyler, 1987. **368**(7): p. 748-748.
337. Laemmli, U.K., *Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-&.
338. Garnier, J., J.F. Gibrat, and B. Robson, *GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence*. Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis, 1996. **266**: p. 540-553.

339. Perczel, A., M. Hollosi, G. Tusnady, and G.D. Fasman, *Convex constraint analysis: a natural deconvolution of circular dichroism curves of proteins*. Protein Eng, 1991. **4**(6): p. 669-79.
340. Bartlett, G.R., *Phosphorus Assay in Column Chromatography*. Journal of Biological Chemistry, 1959. **234**(3): p. 466-468.
341. Struck, D.K., D. Hoekstra, and R.E. Pagano, *Use of Resonance Energy-Transfer to Monitor Membrane-Fusion*. Biochemistry, 1981. **20**(14): p. 4093-4099.
342. Ellens, H., J. Bentz, and F.C. Szoka, *H⁺-Induced and Ca²⁺-Induced Fusion and Destabilization of Liposomes*. Biochemistry, 1985. **24**(13): p. 3099-3106.
343. Kodama, Y. and C.D. Hu, *Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): A 5-year update and future perspectives*. Biotechniques, 2012. **53**(5): p. 285-+.
344. Pogulis, R.J., A.N. Vallejo, and L.R. Pease, *In vitro recombination and mutagenesis by overlap extension PCR*. Methods Mol Biol, 1996. **57**: p. 167-76.
345. Lakowicz, J.R., B.P. Maliwal, H. Cherek, and A. Balter, *Rotational freedom of tryptophan residues in proteins and peptides*. Biochemistry, 1983. **22**(8): p. 1741-52.
346. Tello, D., (Tesis doctoral) *Análisis Estructural y Funcional del complejo E1E2 del Virus de la Hepatitis C*. 2008.
347. Ortega, S., (Tesis Doctoral) *Papel del ectodominio de la proteína E2 del virus de la hepatitis C en la unión y entrada del virus en la célula*. 2012.
348. Peiro, A., L. Martinez-Gil, S. Tamborero, V. Pallas, J.A. Sanchez-Navarro, and I. Mingarro, *The Tobacco mosaic virus movement protein associates with but does not integrate into biological membranes*. J Virol, 2014. **88**(5): p. 3016-26.
349. Tamborero, S., M. Vilar, L. Martinez-Gil, A.E. Johnson, and I. Mingarro, *Membrane Insertion and Topology of the Translocating Chain-Associating Membrane Protein (TRAM)*. Journal of Molecular Biology, 2011. **406**(4): p. 571-582.
350. Orzaez, M., J. Salgado, A. Gimenez-Giner, E. Perez-Paya, and I. Mingarro, *Influence of proline residues in transmembrane helix packing*. J Mol Biol, 2004. **335**(2): p. 631-40.
351. Nilsson, I.M. and G. von Heijne, *Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane*. J Biol Chem, 1993. **268**(8): p. 5798-801.
352. Flint, M., J.M. Thomas, C.M. Maidens, C. Shotton, S. Levy, W.S. Barclay, and J.A. McKeating, *Functional analysis of cell surface-expressed hepatitis C virus E2 glycoprotein*. Journal of Virology, 1999. **73**(8): p. 6782-6790.
353. Vaney, M.C. and F.A. Rey, *Class II enveloped viruses*. Cellular Microbiology, 2011. **13**(10): p. 1451-1459.
354. Garry, R.F. and S. Dash, *Proteomics computational analyses suggest that hepatitis C virus E1 and pestivirus E2 envelope glycoproteins are truncated class II fusion proteins*. Virology, 2003. **307**(2): p. 255-65.
355. Russell, R.S., K. Kawaguchi, J.C. Meunier, S. Takikawa, K. Faulk, J. Bukh, R.H. Purcell, and S.U. Emerson, *Mutational analysis of the hepatitis C virus E1 glycoprotein in retroviral pseudoparticles and cell-culture-derived H77/JFH1 chimeric infectious virus particles*. J Viral Hepat, 2009. **16**(9): p. 621-32.
356. White, S.H. and W.C. Wimley, *Hydrophobic interactions of peptides with membrane interfaces*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1376**(3): p. 339-52.
357. Kyte, J. and R.F. Doolittle, *A simple method for displaying the hydropathic character of a protein*. J Mol Biol, 1982. **157**(1): p. 105-32.
358. Li, H.F., C.H. Huang, L.S. Ai, C.K. Chuang, and S.S. Chen, *Mutagenesis of the fusion peptide-like domain of hepatitis C virus E1 glycoprotein: involvement in cell fusion and virus entry*. J Biomed Sci, 2009. **16**: p. 89.

- 359. Drummer, H.E., I. Boo, and P. Pountourios, *Mutagenesis of a conserved fusion peptide-like motif and membrane-proximal heptad-repeat region of hepatitis C virus glycoprotein E1*. J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 4): p. 1144-8.
- 360. Sapir, A., O. Avinoam, B. Podbilewicz, and L.V. Chernomordik, *Viral and developmental cell fusion mechanisms: conservation and divergence*. Dev Cell, 2008. **14**(1): p. 11-21.
- 361. Rodriguez, M.R., *tesis doctoral*. 2007.
- 362. Peisajovich, S.G. and Y. Shai, *Viral fusion proteins: multiple regions contribute to membrane fusion*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1614**(1): p. 122-9.
- 363. Ciczora, Y., N. Callens, C. Montpellier, B. Bartosch, F.L. Cosset, A. Op de Beeck, and J. Dubuisson, *Contribution of the charged residues of hepatitis C virus glycoprotein E2 transmembrane domain to the functions of the E1E2 heterodimer*. J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 10): p. 2793-8.
- 364. Baeza-Delgado, C., M.A. Marti-Renom, and I. Mingarro, *Structure-based statistical analysis of transmembrane helices*. Eur Biophys J, 2013. **42**(2-3): p. 199-207.
- 365. Langosch, D., B. Brosig, H. Kolmar, and H.J. Fritz, *Dimerisation of the glycophorin A transmembrane segment in membranes probed with the ToxR transcription activator*. J Mol Biol, 1996. **263**(4): p. 525-30.
- 366. Penin, F., J. Dubuisson, F.A. Rey, D. Moradpour, and J.M. Pawlotsky, *Structural biology of hepatitis C virus*. Hepatology, 2004. **39**(1): p. 5-19.